



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PISA

SCUOLA DI DOTTORATO IN FISIOPATOLOGIA CLINICA E  
SCIENZE DEL FARMACO

PROGRAMMA DI VIROLOGIA FONDAMENTALE E CLINICA

MED/07

***“Analisi della suscettibilità alle infezioni con  
virus Cocksackie (B1-B6) di cellule staminali cardiache  
residenti murine”***

DIRETTORE RELATORE:

Prof. Luca Ceccherini-Nelli

DOTTORANDO

Dr.ssa Lucia Bontempo

Anno accademico 2010/2011

## INDICE

<b>RIASSUNTO .....</b>	<b>4</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>9</b>
<b>1.INTRODUZIONE .....</b>	<b>12</b>
1.1 Infarto del miocardio e cardiomiopatia.....	12
1.2 Le miocarditi virali .....	13
1.3 Virus cardiotropici .....	15
1.4 Virus cardiotropici: i Cocksackie virus .....	26
1.5 Meccanismo d'infezione dei virus cardiotropici .....	28
1.6 Terapie .....	35
1.7 Sensibilità alle infezioni.....	39
1.8 Resistenza alle infezioni da HIV, HCV, HBV, CMV .....	41
1.9 Geni coinvolti nella suscettibilità alle malattie infettive .....	47
<b>2.SCOPO .....</b>	<b>48</b>
<b>3.MATERIALI E METODI.....</b>	<b>50</b>
3.1 Colture cellulari	

3.2 Estrazione RNA .....	57
3.3 RT-PCR.....	58
3.4 PCR con primer specifici.....	59
3.5 Saggio Immunoenzimatico.....	62
3.6 Infezione delle linee cellulari, estrazione e rilevazione dell'RNA virale.....	62
3.5 Immunofluorescenza indiretta.....	65
<b>4.RISULTATI.....</b>	<b>67</b>
<b>5.DISCUSSIONE.....</b>	<b>72</b>
<b>6.CONCLUSIONI.....</b>	<b>77</b>
<b>7.PROSPETTIVE FUTURE.....</b>	<b>78</b>
<b>8.BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>79</b>

## Riassunto

L'infarto del miocardio, che è la principale causa di morbidità e mortalità nei paesi industrializzati, è causato nel 50% dei casi da cardiomiopatia dilatativa (CMD) che deriva spesso da una patologia infettiva-infiammatoria a carico del tessuto miocardico (Ellis CR et al., 2007).

Molti studi presenti in letteratura hanno rilevato la presenza di genomi virali nel tessuto cardiaco di pazienti affetti da cardiomiopatia (CM) (Liu P, et al., 2003; Lassner D et al., 2005). E' noto infatti che alcuni virus possono essere agenti eziologici di miocarditi.

I virus maggiormente cardiotropici sono: gli Adenovirus (tipo 2 e 5) ed gli Enterovirus, in particolare i Cocksackie virus (ceppi B1-B6), meno frequentemente il Citomegalovirus (CMV), l'Epstein Barr (EBV), il virus erpetico umano 6 (HHV6), il parvovirus B19 (PVB19) (Nigro G. et al., 2000), il virus dell'epatite C (Prati D. et al., 1999). Sono stati inoltre descritti casi di miocardite virale fulminante da Herpes simplex 1 (HSV-1) ed EBV (Koga et al., 2001, Takaki I. et al., 2005).

Il meccanismo patogenetico d'infezione del miocardio da Adenovirus ed Enterovirus è stato in parte chiarito (Bergelson JM et al., 1997; Tomko RP et al., 1997) con la scoperta del recettore CAR (coxsackie and Adenovirus receptor) e del corecettore DAF (decay-accelerating factor) espressi sulle cellule cardiache.

Il recettore CAR è una proteina del peso molecolare di 46-kDa appartenente alla famiglia delle immunoglobuline ed espresso prevalentemente sui dischi intercalari delle cellule cardiache umane. Il corecettore DAF, del peso molecolare di 70 k Da, è una proteina regolatoria del complemento espressa sulla superficie delle cellule epiteliali ed endoteliali (Selinka H-C et al., 2004). I due recettori sembrano avere attività sinergica per l' internalizzazione virale con conseguente vantaggio nella replicazione e diffusione sia in senso verticale che orizzontale all' interno dei tessuti; inoltre l' effetto sinergico degli anticorpi anti-CAR e anti-DAF suggerisce l' esistenza di un' associazione spaziale delle due proteine a formare un CAR-DAF receptor complex (Martino et al., 1998; Liu P. et Opavsky, 2000).

Secondo recenti studi il CAR-DAF Receptor Complex consentirebbe la penetrazione del virus nelle cellule anche mediante transitosi (Selinka HC et al., 2004), un tipo di pinocitosi utilizzata dagli organismi pluricellulari per trasportare selettivamente macromolecole tra i due ambienti delimitati da una cellula polarizzata, ad esempio tra la superficie apicale e basolaterale di una cellula epiteliale. E' già stato evidenziato in precedenza il fatto che un virus cardiotropico debba attraversare un gran numero di differenti cellule e tessuti, che esprimono ciascuno particolari e specifiche proteine recettoriali, prima di raggiungere la destinazione finale delle cellule cardiache, i miociti. Le barriere epiteliali e quelle endoteliali possono dunque essere superate attraverso un'infezione virale o mediante transitosi del virus. Una riespressione della proteina CAR è stata ben documentata in molte patologie cardiache, quali le miocarditi virali, e potrebbe essere interpretata come un pattern di riespressione embrionale che è stato infatti accertato per molte proteine coinvolte nelle patologie cardiache gravi. Questa riespressione del recettore CAR causerebbe un riassortimento strutturale del miocardio e soprattutto aumenterebbe la suscettibilità all'infezione virale (Poller W et al., 2002).

Le basi molecolari del tropismo cardiaco e del meccanismo patogenetico delle miocarditi causate da CMV, EBV, HHV6, PVB19 e HCV sono ancora ignote.

L'analisi epidemiologico-molecolare dei casi di miocardite virale ha evidenziato che, come per tutte le infezioni virali, soggetti diversi hanno evoluzione clinica infettiva diversa, che potrebbe essere in parte dovuta, nei casi di infezione con virus coxsackie ed adeno, all'espressione transitoria del recettore CAR. E' noto inoltre che esistono soggetti geneticamente resistenti alle infezioni (Velioy VM, 2005; Abdel-Azim et al., 2005).

Nonostante i continui progressi raggiunti negli ultimi anni nella conoscenza dei meccanismi molecolari e cellulari della fisiopatologia cardiaca, ad oggi, mancano trattamenti farmacologici risolutivi in grado di preservare le cellule cardiache contrattili danneggiate durante l'infarto. Pertanto l'unico trattamento possibile per curare questa patologia è rappresentato dal trapianto d'organo o impianto di cellule staminali (Forte G et al., 2009).

Allo scopo di selezionare cloni eventualmente resistenti all' infezione da virus cardiotropici, da poter poi espandere e perfondere al momento del bisogno, sono state acquisite cellule staminali cardiache adulte murine ingegnerizzate con la sub unità catalitica delle telomerasi, c-tert, sviluppate nel laboratorio di Cardiologia Molecolare e Cellulare, Università di Torvergata Roma. Tali cellule non manifestano ne' senescenza ne' differenziamento. Considerando che i mioblasti midollari umani risultano suscettibili di infezione con Adenovirus (Kohtz DS, et al., 1991), è stata saggiata la suscettibilità delle cellule staminali acquisite all'infezione con una miscela di isolati di enterovirus umani coxsackie B1-B6 (ceppi vaccinali di riferimento) principali cause di miocardite ad eziologia virale e a seguire con i singoli ceppi B1, B2, B3, B4, B5, B6, per ovviare a fenomeni di interferenza virale o maggiore suscettibilità ad uno dei ceppi utilizzati, alla concentrazione di 100 dosi citopatiche al 50% in 75µl e cinque diluizioni seriali in base 10. Come controllo positivo è stata utilizzata la linea cellulare KB (Human Epidermoid Carcinoma, Istituto Zooprofilattico Bruno Ubertini), che è permissiva e competente all'infezione da enterovirus ed esprime il recettore CAR (Terletskaia-Ladwig et al., 2008). E' stata verificata l'espressione del recettore CAR come mRNA mediante RT-PCR e PCR con primer specifici (Sollerbrant et al., 2007) e successivamente la sua presenza come proteina sulle cellule mediante saggio immunoenzimatico.

Dopo 48, 72 e 96 ore dall'infezione è stato ricercato il genoma virale nel surnatante e nelle cellule separatamente mediante RT- PCR e Nested PCR utilizzando primer all- entero (Simmonds et al., 2009). E' stata valutata l'espressione di antigeni virali mediante IFA indiretta.

Risultati:

- Il recettore CAR è espresso come RNA e tradotto come proteina nella linea staminale c-tert.
- Le linee staminali c-tert non hanno mostrato alcun effetto citopatico a tutti i tempi dall'infezione e a tutte le diluizioni, al contrario della linea cellulare KB che già dopo 48 ore presentava segni di morte cellulare.

- L'analisi molecolare ha confermato la presenza del genoma virale all'interno della linea c- tert infettata sia con la miscela dei 6 ceppi che con i ceppi singoli, pressochè a tutti i tempi dell'infezione analizzati e alle prime diluizioni utilizzate, così come nel controllo positivo, la linea cellulare KB.
- Il genoma virale rilevato nel surnatante delle colture della linea KB, non è stato rilevato nei surnatanti di nessuna delle colture della linea c- tert infettate.
- L'analisi mediante IFA ha confermato che gli antigeni virali sono espressi nella linea di controllo KB ma non nelle colture della linea c- tert.

I risultati ottenuti sembrano dimostrare che:

- le cellule staminali cardiache c-tert siano permissive nei confronti dei ceppi vaccinali di Cocksackie virus B1-B6, in quanto il virus penetra all'interno delle cellule, che risultano quindi positive per il genoma virale;
- le cellule staminali cardiache c-tert non sarebbero competenti, ovvero non disporrebbero di un adeguato macchinario biosintetico e molecolare che permetta al virus di replicarsi attivamente. Il genoma virale, infatti, non si ritrova nel surnatante delle colture infettate ne' quest'ultime esprimono antigeni virali sulla superficie cellulare.

Le prospettive future sono:

- Un possibile impiego della linea cellulare c-tert per terapia cardiomiocitica sostitutiva nel modello di infarto sperimentale murino.

- L'analisi del pattern di espressione di geni coinvolti nel pathway infiammatorio ed apoptotico della linea staminale c-tert, in seguito ad infezione virale, mediante microarray dedicati, al fine di analizzare il meccanismo molecolare di interazione virus-cellula.



## Abstract

Myocardial stroke is the leading cause of morbidity and mortality in industrialized countries; in the 50% of cases it is caused by dilated cardiomyopathy (CMD) with inflammatory-infectious etiology of the myocardial tissue (Ellis CR et al., 2007).

Many studies demonstrated the presence of different viral genomes in heart tissue of patients with cardiomyopathy (CM) (Liu P, et al. 2003; Lassner D et al., 2005). Adenovirus (type 2 and 5) and Enterovirus, particularly Coxsackie virus (strains B1-B6), are the most frequently involved. Other viruses are Citomegalovirus (CMV), Epstein Barr virus (EBV), Human herpetic virus 6 (HHV6), Parvovirus B19 (PVB19) (Nigro et al., 2000), Hepatitis C virus (Prati D et al., 1999), Herpes simplex 1 (HSV-1).

The pathogenetic mechanism of the myocardial viral infection of Adenovirus and Enterovirus has not yet been fully explained. Many studies report that the receptor "Coxsackie and Adenovirus Receptor" (CAR) that is immunoglobulin protein of 46-kDA and the co-receptor "Decay-Accelerating Factor" (DAF) that is complement protein of 70-kDA, expressed on myocardial cells, would synergistically allow virus-cell recognition and adsorption (Bergelson JM et al., 1997; Tomko RP et al., 1997). It has been reported that the receptor CAR and the co-receptor DAF form a "CAR-DAF Receptor Complex" that allows efficient internalization and viral spread both vertically and horizontally within the tissue by transcytosis (Martino TA et al., 1998; Liu P. et Opavsky, 2000). The pathogenetic mechanism of other miocardic virus has not yet been known.

Despite the immense progress achieved in recent years for the comprehension the molecular and cellular mechanism of heart pathophysiology, to date, there are no decisive pharmacological treatments to preserve damaged contractile heart cells during the stroke; therefore the only possible treatment is organ transplantation or implantation of stem cells (Forte G. et al, 2009). Cell therapy with adult stem cells, with capacity to generate new cardiomyocytes, may therefore represent a possible approach to replace the irreversibly damaged cardiomyocytes after heart

faillure (Forte G. et al., 2009).

The evolution of infectious diseases caused by various microorganisms is substantially influenced by host genetic variability, especially in relation to defense mechanisms and refers to a polygenic variability in the different susceptibility of different individuals and different populations (Veliov VM, 2005; Abdel-Azim GA et al., 2005).

Purpose of this study is to test the susceptibility to infection with vaccine strains of Coxsackie virus (B1-B6 strains), of murine cardiac adult stem cells, engineered with a catalytic subunit of telomerase c-tert (Molecular and e Cellular Cardiology Laboratory, University of Torvergata Rome) , in order to select resistant clones that could be perfuse after heart failure.

To verify the expression of CAR genes, RNA was extracted and retrotranscribed with reverse primer. Specific genomic regions of CAR were amplified with specific primers as previously described (Sollerbrant K. et al., 2007). The expression of CAR as protein was analysed by immunoenzymatic assay.

The cell line was then infected with a mix of Coxsackie virus B1-B6 vaccine strains and with the 6 strains separately (100 to 50% cytopathic doses in 75µl and 5 10 serial dilutions) in order to avoid viral interference or higher sensitivity to one of the six viral strains tested. The cell line KB (Human Epidermoid Carcinoma, Zooprophyllactic Institute Bruno Ubertini) was used as a positive control. The infected cell cultures were analyzed after 48, 72 and 96 hours after infection, with an optical microscope to detect the cytopathic effect. At each time RNA was extracted separately from supernatant and cells previously washed 3 times in saline buffer. The presence of viral RNA was investigated by RT-PCR and nested PCR using primers *all-entero* (Simmonds et al., 2009). Analysis of the expression of viral antigens on the cell surface was performed by indirect IFA.

#### Results:

- CAR receptor RNA is expressed in the stem cell line c-tert and is translated as protein in the stem cell line c-tert.

- C-tert cell line never showed cytopathic effect after infection with the mixture of Coxsackie virus and with the 6 strains separately at all times and with all dilution employed, contrary to the KB cell line (positive control) that already 48 hours after infection showed signs of cell death at least at the third dilution.
- Molecular analysis found the viral genome at all times after infection within the c-tert cell line infected at least until the third dilution of the Coxsackie virus mixture and separately with the 6 strains, as in the KB positive control.
- The viral genome was also found in the supernatant of KB cell line, but in none supernatant of the c-tert infected cultures.
- IFA detected the expression of viral antigens only in the KB cells, but in none of the c-tert infected cultures.

#### Conclusions:

the obtained results seem to show that c-tert cardiac stem cells seem allow Coxsackie virus B1-B6 entrance, but not its replication.

#### Future purposes:

- Consider a possible use of cell line c-tert for cell therapy in mouse model.
- Analyze the pattern of expression of the cellular genes involved in inflammatory and apoptotic pathways of the c-tert cell line, after viral infection, by dedicated microarray, in order to understand the molecular mechanism of virus-cell interaction.

# **1.Introduzione**

## **1.1 Infarto del miocardio e cardiomiopatia**

L'infarto del miocardio che è la principale causa di morbidità e mortalità nei paesi industrializzati è causato nel 50% dei casi da cardiomiopatia dilatativa (CMD), che deriva spesso da una patologia infiammatoria a carico del tessuto miocardico (Ellis CR et al., 2007).

La CMD e' una disfunzione a carico del muscolo cardiaco che lo rende incapace di pompare una sufficiente quantità di sangue ad organi e tessuti da cui ne consegue dilatazione ventricolare, riduzione della funzione sistolica e scompenso cardiaco congestizio. Alcuni fattori di rischio, genetici e/o acquisiti, classificabili come fattori di rischio coronarico, rendono la maggior parte dei soggetti colpiti predisposti all' insorgenza dell' infarto (Davidson C, 2008). La "CMD idiopatica" deriva da alterazioni del muscolo cardiaco geneticamente determinate, sporadicamente o familiarmente, a carico del solo muscolo cardiaco o anche di altri tessuti muscolari dell'organismo; i geni coinvolti codificano per proteine del citoscheletro e non del sarcomero come nel caso della cardiomiopatia ipertrofica.

Le cause della CMD sono diverse quali l' ipertensione arteriosa, la cardiopatia ischemica che sono tipiche conseguenze delle cattive norme comportamentali del nostro tempo (alimentazione, sedentarietà e obesità); alcuni farmaci (antracicline, ciclofosfamide, tetracicline); sostanze tossiche e stupefacenti (es. etanolo, cocaina, eroina, ecc.); agenti virali, batterici, parassitari e micotici. Spesso non è possibile riconoscere una causa certa.

## 1.2 Le miocarditi virali

La miocardite è un processo infiammatorio a carico del muscolo cardiaco il cui decorso clinico può essere benigno, con completa risoluzione dell'inflammazione, o avere conseguenze molto severe, quali, in un terzo dei casi, lo sviluppo di cardiomiopatia dilatativa (CMD) (Ellis CR et al., 2007) e il conseguente scompenso cardiaco congestizio.

L'infiltrato infiammatorio nella miocardite è, nella maggior parte dei casi, costituito da fibroblasti e linfociti. Meno frequentemente si riscontrano altri tipi di reazione infiammatoria, che coinvolgono cellule giganti, eosinofili e granulomi: questi specifici infiltrati possono essere associati a diverse condizioni cliniche e malattie sistemiche, e vanno perciò differenziati (Conti G, Terapia Intensiva, 2007). Nella miocardite l'inflammazione può colpire i cardiomiociti, l'interstizio, gli elementi vascolari e il pericardio. In casi sporadici l'inflammazione può presentarsi senza necrosi dei miociti (miocardite borderline), ma classicamente è accompagnata da lesione necrotica, focale o diffusa a seconda dell'entità del danno. Non si ha in nessun caso rigenerazione tissutale e i cardiomiociti danneggiati o completamente distrutti vengono sostituiti da tessuto fibroso o fibro-adiposo, provocando la comparsa di aree ipocinetiche nel miocardio (Crea F, Malattie del cuore di Braunwald, 2007).

Dalle diagnosi post-mortem le miocarditi risultano la causa più frequente di morte improvvisa negli individui sotto i 40 anni (Mahrholdt H et al., 2006).

La miocardite può essere fulminante o acuta.

La miocardite fulminante si sviluppa solitamente dopo un periodo di latenza di diverse settimane e comporta la compromissione emodinamica del cuore e possibile shock cardiogeno; tuttavia, i pazienti affetti da miocardite fulminante hanno una prognosi migliore a lungo termine rispetto a quelli affetti da miocardite acuta, infatti quest'ultima che non ha un esordio temporalmente definito né una situazione ipotensiva grave, più frequentemente provoca la morte o necessita di trapianto cardiaco a causa della sua evoluzione in CMD (Cooper LT, Jr, MD, 2009). La miocardite spesso dovuta ad una infezione cardiaca localizzata, meno

frequentemente è associata ad una malattia sistemica che implica il massiccio intervento del sistema immunitario. Oppure dopo una fase acuta può risolversi in modo rapido e completo con eliminazione del virus; in altri casi, invece, dopo uno stadio clinico iniziale asintomatico l'infezione virale può trasformarsi in una miocardite cronica con lunga persistenza del genoma virale nel miocardio (Liu PP et al., 2001), che presenta una prognosi peggiore rispetto al decorso acuto (McCarthy RE 3rd et al., 2000). Il decorso clinico della miocardite dipende, tra l'altro, da un equilibrio che si instaura tra l'infezione virale e la risposta immunitaria dell'ospite (Liu PP et al., 2000; Knowlton KU et al., 1999).

Indagini sierologiche e molecolari evidenziano che gli Adenovirus di tipo 2 e 5 e gli Enterovirus, in particolare Coxsackievirus ceppi B1-B6, sono gli agenti eziologici predominanti della miocardite virale (Nigro G et al., 2000; Takano H et al., 2008).

Le infezioni virali del miocardio possono essere sostenute anche da altri agenti virali quali: Citomegalovirus (CMV) (Schönian U et al., 1993; Zubiaurre L et al., 2007), virus di Epsteinbarr (EBV) (Takano H et al., 2008), virus dell'epatite C (HCV) (Prati D et al., 1999), Parvovirus B19 (PVB19) (Nigro G et al., 2000) e virus erpetico umano 6 (HHV6) (Rohayem J et al., 2001).

In base ad un modello umano e murino di miocardite virale si possono distinguere tre fasi principali. La prima consiste nel processo infettivo, in cui si ha una prima replicazione dei virus all'interno del tessuto linfoide e la stimolazione della risposta immunitaria innata. Successivamente i virus, trasportati attraverso il sistema linfatico dell'ospite, raggiungono il cuore e infettano i cardiomiociti; le proteasi virali e le citochine infiammatorie causano i danni cellulari diretti. Durante questa prima fase è difficile diagnosticare una miocardite, dato che i pazienti sono spesso asintomatici e i metodi di screening poco efficaci.

Durante la seconda fase si attiva la risposta immunitaria specifica dell'ospite, finalizzata ad attenuare la proliferazione dei virus. L'immunità umorale e l'immunità cellulo-mediata possono completare la clearance dell'agente infettivo e subire un progressivo declino oppure essere sottoposte ad una continua attivazione a causa della persistenza dei virus nel miocardio ed il mimetismo

antigenico tra gli antigeni espressi dal tessuto cardiaco e gli antigeni virali (Kühl U et al, 2005).

Un'iperattivazione della risposta immunitaria nella terza fase della miocardite comporta un rimodellamento finale della struttura cardiaca compromettendo la funzione contrattile dei ventricoli, condizione nota come cardiomiopatia dilatativa (Liu PP, 2001; Luo H et al, 2010 ).

### **1.3 Virus cardiotropici**

Inizialmente i virus Cocksackie erano considerati la principale causa di miocardite virale perché nei pazienti con miocardite acuta o convalescenti venivano frequentemente rilevati anticorpi anticocksackie (Feldman AM et al., 2000). In seguito altri Enterovirus e gli Adenovirus sono stati rilevati in campioni biotipici di pazienti con miocarditi transienti alla cronicizzazione (Kandolf R, 2004). PVB19 e HHV6 sono stati ritrovati in biopsie di endomiocardio e sono risultati la maggiore causa di miocarditi in Germania (Mahrholdt H et al., 2006). L'infezione cronica attiva da EBV (CAEBV) è caratterizzata da ricorrenti infezioni con sintomi simili alla mononucleosi con prognosi benigna, ma esiste la possibilità di insorgenza di miocarditi in quanto CAEBV disorganizza e necrotizza le cellule miocardiche causando una perdita della loro funzionalità (Ishikawa T et al., 2005; Takano H et al., 2007). Anche l'infezione da HCV è stata associata alle miocarditi virali non solo attraverso tecniche biomolecolari in grado di rilevare il genoma di HCV nelle biopsie miocardiche, ma anche attraverso dati epidemiologici che indicano una forte associazione tra l'insorgenza di miocarditi virali in zone fortemente endemiche per HCV (Matsumori A et al., 2006). CMV infetta comunemente ospiti sia immunocompetenti che immunocompromessi producendo infezioni asintomatiche e patologie con sintomi da lievi a molto gravi. CMV causa malattia non solo durante l'infezione primaria, che si localizza in vari organi, ma è causa di morbidità anche durante la riattivazione in pazienti immunodepressi. Inoltre, CMV può indurre una lunga latenza instaurando una patologia cronica miocardica (Schönian U et al., 1993; Zubiaurre L et al., 2007).

Mentre il meccanismo patogenetico degli Enterovirus e Adenovirus a livello del miocardio è stato oggetto di molti studi ed è stato in parte chiarito, le basi molecolari delle infezioni e delle patologie del miocardio ad eziologia virale indotte da CMV, EBV, HCV, PVB19 e HHV6 sono ancora ignote.

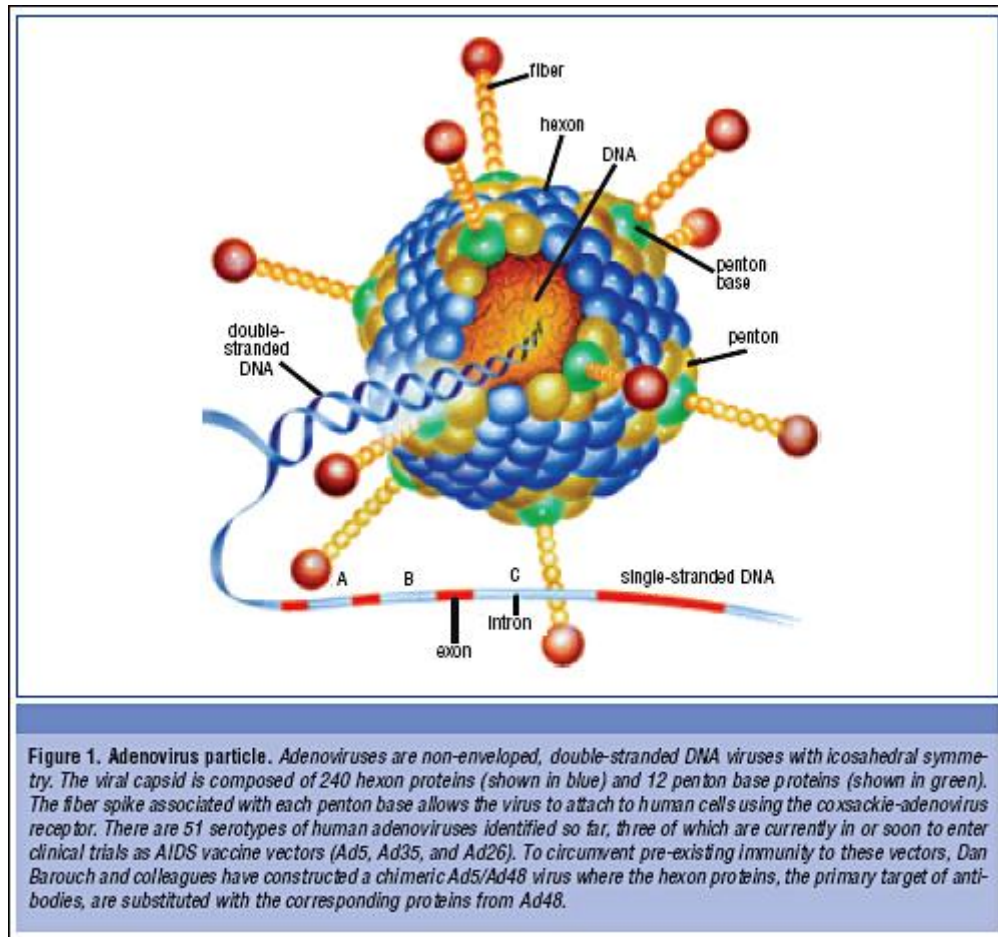
Molti studi hanno rilevato la presenza di genomi virali nel tessuto cardiaco di pazienti affetti da CMD (Martino TA et al., 1994; Kuhl U et al., 2005), in particolare, è stato riscontrato che i virus maggiormente cardiotropici sono Adenovirus (tipo 2 e 5) ed Enterovirus, in particolare Coxsackie virus (ceppi B1-B6).

Gli **Adenovirus** (Figura n. 1) e gli **Enterovirus** infettano l'ospite per via aerea e/o per via oro-fecale. Sebbene non correlati filogeneticamente, il meccanismo patogenetico d' infezione del miocardio da adenovirus ed enterovirus è stato in parte chiarito (Bergelson JM et al., 1997; Tomko RP et al., 1997) con la scoperta del recettore CAR (*coxsackie and adenovirus receptor*) che entrambi sfruttano per l'adsorbimento e l'ingresso nelle cellule suscettibili.

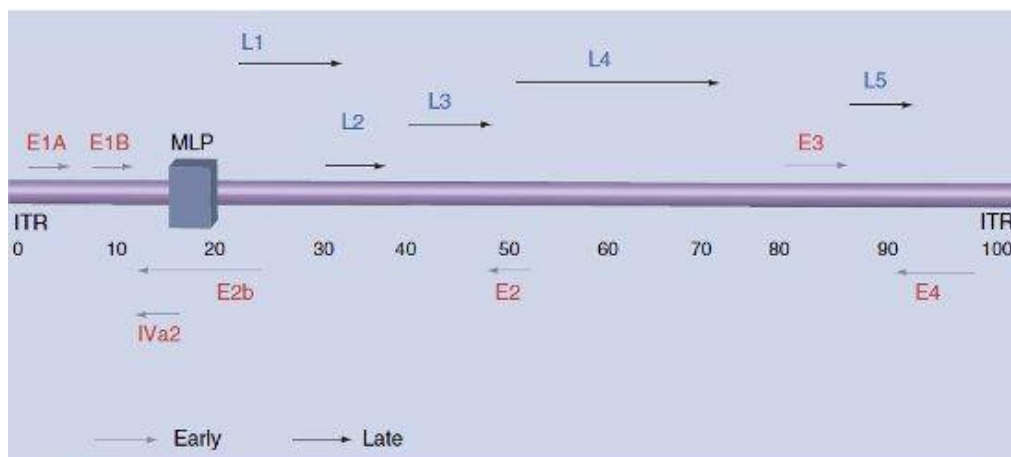
Gli **Adenovirus** sono virus a DNA a doppio filamento, caratterizzati da simmetria icosaedrica e sprovvisti di involucro lipidico. Il loro ciclo vitale inizia col legame delle proteine fibrose del capsido ai recettori cellulari e l' internalizzazione tramite endocitosi. La fusione delle vescicole endocitotiche con lisosomi e il cambio di pH dell'ambiente determina un cambiamento conformazionale del capsido, cui segue la liberazione del DNA virale, che rimane in forma episomiale nel nucleo della cellula.

Nel genoma degli Adenovirus, grande circa 36 Kb, si individuano due regioni codificanti per geni espressi precocemente (*early*, E) e tardivamente (*late*, L). Ai lati del genoma si trovano le cosiddette sequenze terminali invertite (ITR, *Inverted Terminal Repeat*), necessarie per la replicazione del virus (Figura n. 2). L'espressione dei geni E1 (precoci immediati) permette la trans-attivazione dei geni E2 ed E4 che determinano il blocco della sintesi proteica cellulare e partecipano alla replicazione del DNA virale. Per ultimi vengono attivati i geni tardivi, che codificano per le proteine strutturali le quali, una volta formate, si assemblano circondando il DNA neoformato. Le particelle virali fuoriescono dalla cellula in seguito ad una completa citolisi (Wagner KE et al, 2008).





**Fig. n.1** Adenovirus- *iavireport.org* CROI 2007

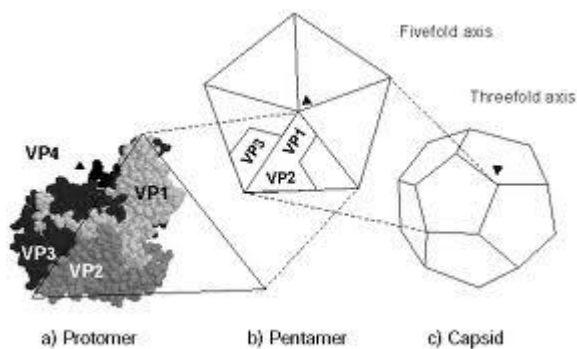


**Fig. n. 2** Adenovirus, genome; *medscape.com*.

Gli **Enterovirus** sono dei ribovirus appartenenti alla famiglia delle **Picornaviridae**, presentano genoma ad RNA a singolo filamento con polarità positiva (+) delle dimensioni di 75 Kb ,e capside isometrico di 27-30 nm.

L'assenza dell'envelope lipidico e del pericapside è una caratteristica che li rende stabili a ph acido (compreso tra 3 e 9), resistenti al calore e a numerosi detergenti, insensibili agli eteri. In particolare, resistono all'acidità del succo gastrico ed alla bile presente nell'intestino e possono sopravvivere a lungo nell'ambiente esterno (La Placa M et al., 2008).

Il capside dei Picornavirus presenta una geometria icosaedrica, con 60 unità strutturali (protomeri) i cui raggruppamenti pentamerici costituiscono i 12 vertici dell'icosaedro. I protomeri sono composti da quattro polipeptidi denominati VP1, VP2, VP3, VP4, che si originano dal taglio di un unico precursore VP0 ad opera di una proteasi virale. VP1, VP2 e VP3, costituiscono la struttura esterna del capside, mentre VP4 è collocato internamente, e svolge una importante funzione stabilizzatrice (Figura n. 3). L'assemblaggio dei 4 polipeptidi crea uno spazio vuoto, un "canyon" , con funzione di antirecettore virale che permette l'interazione con proteine di membrana delle cellule suscettibili ai virus (La Placa M et al, 2008).



**Fig. n. 3** Protomeri-ethesis.helsinki.fi

I virus penetrano nelle cellule legandosi a specifiche proteine della membrana, diverse a seconda della specie. La presenza o assenza di queste proteine che

fungono da recettori determina il tropismo dei vari ceppi virali e la patogenesi delle malattie causate da questi virus. Tutti gli Enterovirus interagiscono con i recettori cellulari grazie ad uno spazio interposto tra le proteine esterne del capsido, definito “canyon”. Le particelle virali vengono internalizzate in endosomi cellulari, nei quali avviene l’ “uncoating” del virus: il capsido perde unità strutturale e l’ acido nucleico viene liberato nel citoplasma delle cellule infettate. Il genoma presenta un unico open reading frame, e viene tradotto immediatamente in una poliproteina, successivamente processata dalle proteasi virali in proteine di dimensioni minori con funzioni strutturali ed enzimatiche, inclusa la stessa polimerasi virale che servirà per sintetizzare copie aggiuntive del genoma. In seguito il genoma viene trascritto in un filamento complementare negativo, che servirà da “templato” per la produzione di numerose copie di RNA positivo, in parte tradotte nelle proteine strutturali del capsido e in parte utilizzate come nuova informazione genetica per la progenie virale (Figura n. 4).



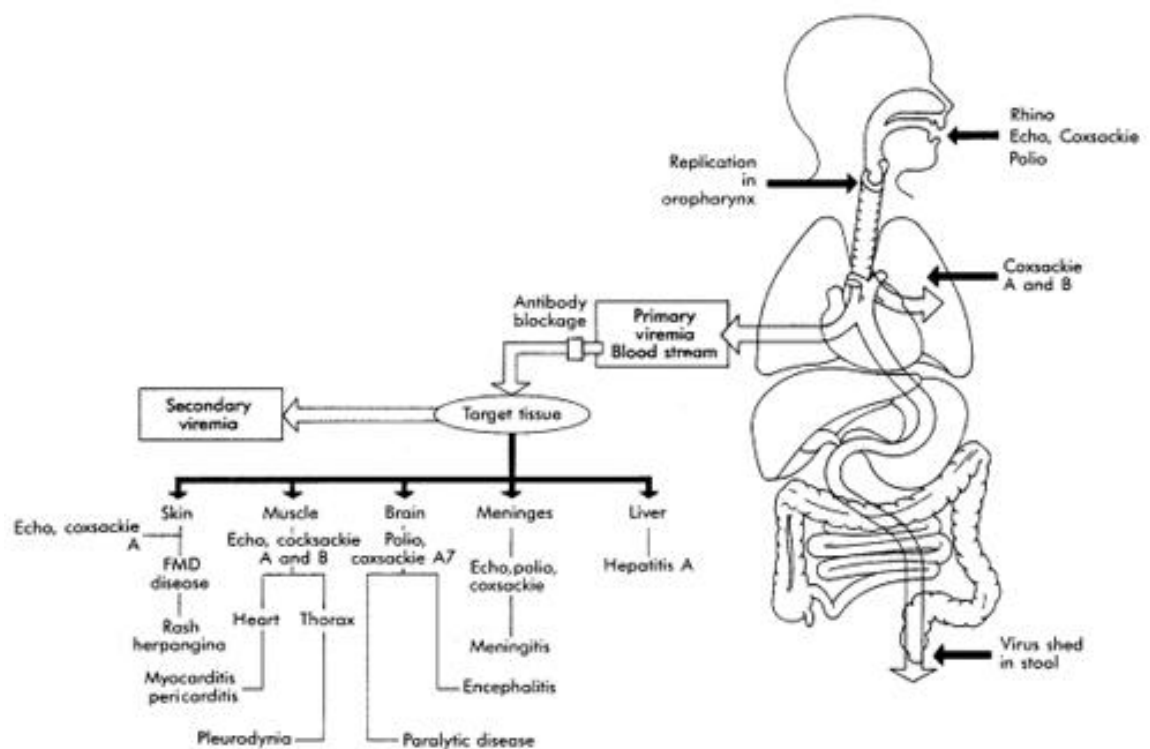


Fig. n. 5 Patogenesi degli Enterovirus-meddean.luc.edu

La prima risposta immunitaria è aspecifica, macrofagi, natural killer (NK), attivazione del complemento. In seguito si ha la produzione di citochine ed altri mediatori quali il tumor necrosis factor (TNF), l'interleuchina 1 (Il1) e l'interleuchina 6 (Il6). Un rilascio eccessivo di citochine può causare cronicizzazione dell'infiammazione e danni tissutali diretti. La risposta specifica è di tipo sia umorale sia cellulare, mediata dalle immunoglobuline secrete dai Linfociti B la prima e dall'effetto citopatico dei Linfociti T la seconda. Oltre alla segnalazione mediata dalle citochine, ulteriori meccanismi di presentazione degli antigeni virali ai linfociti aumentano l'intensità e la specificità della risposta immunitaria (Abul KA et al, Immunologia cellulare e molecolare, 2010). Le cellule infettate vengono fagocitate da APC professionali, che espongono poi sulla

loro superficie gli antigeni proteici del capside virale, adeguatamente processati nell'apparato del Golgi ed associati a recettori MHC di classe I (Major histocompatibility complex I), specifici per i patogeni intracellulari. Attraverso questo tipo di segnalazione, accompagnata dal riconoscimento di molecole co-stimolatorie che aumentano l'affinità del legame tra antigene e recettore, vengono reclutati e attivati dei linfociti citotossici (CTL) o CD8<sup>+</sup>, che eliminano l'antigene lisando le cellule infettate. Anche nella fase extracellulare del loro ciclo biologico, i virus vengono captati da APC specializzate. I Linfociti B, oltre a sintetizzare e secernere immunoglobuline dirette contro gli epitopi del capside con funzione neutralizzante e opsonizzante per i macrofagi, si comportano come se fossero delle APC: fagocitano i virus e li processano, esponendo i peptidi del capside in associazione al complesso MHC di classe II (Major histocompatibility complex II), specifico per i patogeni e gli antigeni plasmatici. Il riconoscimento del complesso MHC-antigene causa l'attivazione di linfociti T helper (CTH) o CD4<sup>+</sup> (Abul KA et al, Immunologia cellulare e molecolare, 2010). Le citochine infiammatorie overesprese nella prima fase (TNF, IL6, IL8) causano direttamente dilatazione del tessuto attivando delle metallo-proteinasi come gelatinasi, collagenasi ed elastasi. Infine, l'iperattivazione dei linfociti CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e il processo autoimmune, promosso dal mimetismo antigenico tra gli antigeni virali e quelli cardiaci (Figura n. 6), aggrava lo sviluppo della CMD (Cooper LT, MD, 2009).

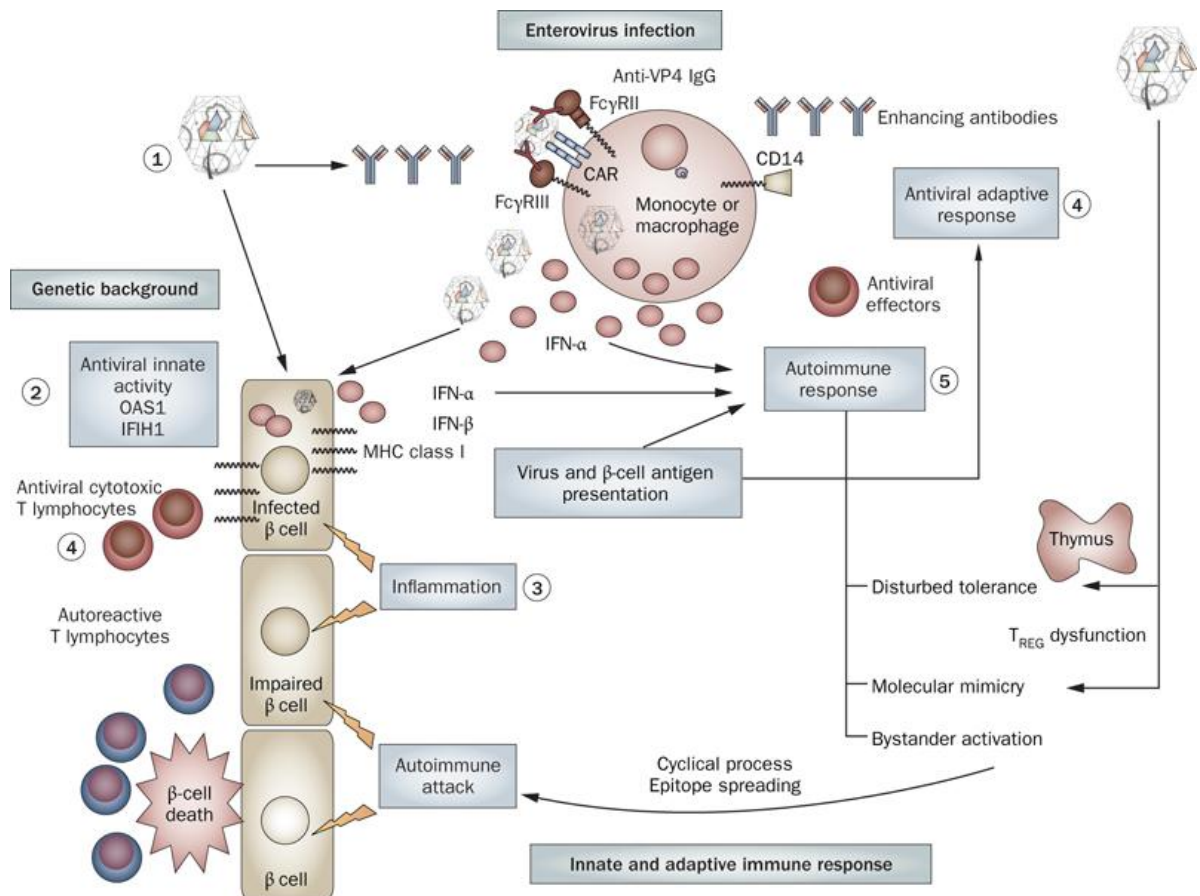


Fig. n. 6 Risposta immunitaria-nature.com

Gli Enterovirus sono estremamente variabili per specie e sierotipo. Fino agli anni sessanta gli Enterovirus erano divisi in **Poliovirus**, comprendente i tre sierotipi agenti eziologici della poliomielite paralitica umana; **Coxsackie virus**; **Echovirus**, (ECHO: Enteric Cytopathogenic Human Orphan; isolati in soggetti sani, quindi si tratta di virus “orfani” di una patologia).

La nomenclatura attuale, basata sulle omologie del genoma virale, ha individuato 5 specie in cui vengono distribuiti 62 dei 64 sierotipi del genere:

1. Poliovirus, (Poliovirus umano 1, 2, 3);

2. Enterovirus umano A (10 sierotipi) con Coxsackie virus A2, A3, A5, A7, A8, A10, A12, A14, A16 e Enterovirus umano 71;
  3. Enterovirus umano B (36 sierotipi) con Coxsackie virus A9, B1/B6, Echovirus 1/7, 9, 11/21, 24/27, 29/33, Enterovirus umano 69;
  4. Enterovirus umano C (11 sierotipi) con Coxsackie virus A1, A11, A13, A15, A17/A22, A24;
  5. Enterovirus umano D (2 sierotipi) con Enterovirus umano 68 e 70
- Rimangono a sé Coxsackie virus A4 e A6 (La Placa M et al., 2008).

L'ampio spettro d'ospite si riflette nella suscettibilità di molti citotipi all'infezione con Enterovirus per l'isolamento in vitro caratterizzato da un effetto citopatico di tipo litico (La Placa M et al., 2008).

La trasmissione degli Enterovirus umani avviene attraverso il circuito oro-fecale (oro/faringe, tratto gastrointestinale) con un'incidenza prevalente durante il periodo estivo-autunnale. L'Enterovirus 70, invece, si trasmette per impianto diretto sulla congiuntiva (dita contaminate) (La Placa M et al., 2008). I virus attraversano passivamente le mucose attraverso le cellule M (microfold) presenti in superficie in corrispondenza degli aggregati di cellule linfoidi sottomucosi, dove probabilmente avviene una moltiplicazione primaria seguita, eventualmente, dalla diffusione linfo-ematica alle cellule del reticolo-endotelio e, successivamente, la trasmissione dell'infezione agli organi bersaglio (La Placa M et al., 2008).

A causa dell'ampio spettro di suscettibilità, gli Enterovirus sono gli agenti eziologici di molte patologie, quali poliomelite, meningite asettica, faringite, che dipendono dal sito principale di replicazione virale (La Placa M et al., 2008). Le patologie più conosciute e rilevanti sono:

La congiuntivite acuta emorragica, causata dall'**Enterovirus 70**, che è un'infiammazione della congiuntiva accompagnata da emorragia sottocongiuntivale.



La congiuntivite acuta non emorragica che è una congiuntivite senza manifestazioni emorragiche, causata da ceppi di **Coxsackievirus A24** ed **Echovirus 7**.

Esantemi e rush cutanei, causati da **Coxsackievirus** ed **Echovirus**.

Herpangina, malattia causata da **Coxsackievirus A** e, talvolta, da altri Enterovirus come **Coxsackie B** ed **Echovirus**, si presenta spesso in forma epidemica in lattanti e bambini e occasionalmente coinvolge adolescenti e adulti.

Hand, foot and mouth disease (Malattia di “Mani, piedi, bocca”): patologia causata dal **Coxsackievirus A16** e dall’**Enterovirus 71**, con un periodo di incubazione che va dai 3 ai 7 giorni e con un decorso simile a quello dell’herpangina. È frequente nei bambini e negli adulti immunodeficienti. Le lesioni vescicolari sono di diametro maggiore rispetto a quelle provocate dall’herpangina e perciò distinguibili all’osservazione.

Malattie respiratorie causate da **Coxsackievirus** che possono colpire lattanti e bambini, caratterizzate da febbre, corizza, faringite. Sopraggiunte complicazioni possono fare evolvere le patologie lievi in bronchiti e polmoniti interstiziali.

Meningite asettica, infezione virale dovuta a ceppi di **Coxsackievirus** di gruppo **A** o **B** o **Echovirus**.

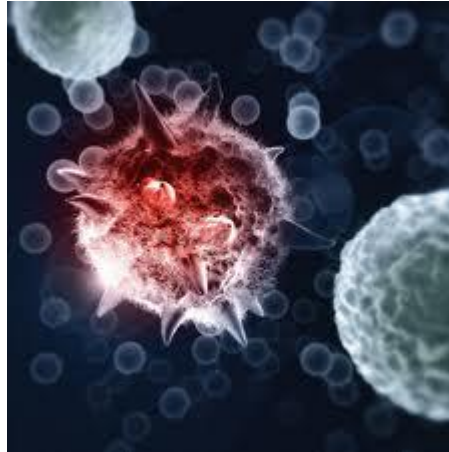
Miocardite e pericardite, causate in particolar modo da **Coxsackievirus B**.

Pleurodinia (Malattia di Bornholm), infiammazione della pleura causata dai **Coxsackievirus** gruppo **B**.

Poliomielite (dal greco: poliòs = grigio, sostanza grigia, e muelòs = midollo), un’infiammazione della sostanza grigia del midollo spinale causata da **Poliovirus**; la forma clinica più comune è la poliomielite anteriore o paralisi infantile o malattia di Heine-Medin, infezione contagiosa che può presentare qualche variazione da un’epidemia all’altra e da una regione all’altra.

## 1.4 Virus Cardiotropici: i Cocksackievirus.

Gli Enterovirus maggiormente cardiotropici sono rappresentati dai **Cocksackie virus B1-B6** (Martino TA et al., 2000) (Figura n. 7).



**Fig. n. 7** Cocksackie virus B- *uochb.cz*

I virus **Cocksackie** sono stati scoperti nel 1948-49 da Gilbert Dalldorf, presso il New York State Department of Health di Albany, New York, mentre stava cercando una cura per la poliomelite. I primi esperimenti, condotti sulle scimmie, suggerirono che fluidi ricavati da una preparazione di virus non poliomielitici potessero proteggere dagli effetti della poliomelite. Ispirandosi agli studi degli scienziati Danesi Orskov e Andersen che lavoravano sui topi neonati per lo studio dei virus murini, continuò gli esperimenti sugli stessi utilizzandoli come vettore. Dalldorf tentò di isolare questi virus protettivi dalle feci dei pazienti poliomielitici e scoprì virus che imitavano una poliomelite blanda o non paralizzante. I virus derivarono il nome di Cocksackie, da un piccolo paese sul fiume Hudson nello stato di New York dove Dalldorf aveva lavorato sui primi campioni di feci (La Placa M et al., 2008). La scoperta dei Cocksackievirus ha fornito nello stesso tempo ulteriori conferme al dato sperimentale che alcuni virus possono interferire sull'infettività e nella replicazione di altri. I topolini infettati con virus Cocksackie acquistavano immunità nei confronti dei Poliovirus; tale effetto protettivo

risultava inoltre più marcato e portava alla sopravvivenza di un maggior numero di cavia se l'inoculazione dei Coxsackie avveniva **prima** piuttosto che **in contemporanea** all'iniezione intracerebrale del virus della poliomelite (Dalldorf G, 1950). L'immunità non era però dovuta al fenomeno dell'interferenza virale o alla competizione da parte dei virus per un particolare recettore cellulare. Studi successivi condotti dagli scienziati Jean Lindermann e Alick Isaacs hanno chiarito il ruolo in questo processo di alcuni peptidi specifici, in grado di stimolare la risposta immunitaria dell'ospite e di inibire la replicazione virale: gli **Interferoni (INF)**. Esistono tre tipi principali di interferoni, di cui fanno parte diversi sottotipi. Quelli che vengono sintetizzati per attenuare la replicazione virale sono gli interferoni di tipo I, in particolare l' INF  $\alpha$  (alfa), l' INF  $\beta$  (beta) e l' INF  $\omega$  (Male D, Immunology, 2006).

Gli interferoni, citochine infiammatorie, che in seguito all'infezione virale, segnalano la presenza del virus alle cellule circostanti, diffondono da cellula a cellula e attivano vie di trasduzione del segnale specifiche. I virus ad RNA sono quelli che maggiormente stimolano la produzione di INF che a loro volta promuovono l' attivazione di un gruppo di geni coinvolti nella protezione della cellula, che acquisisce uno "stato antivirale". Questo stato è mantenuto in particolar modo da due enzimi che inibiscono la sintesi proteica: uno dei due agisce indirettamente sulla sintesi proteica, provocando la degradazione dell'RNA virale, mentre il secondo interviene in maniera diretta, inibendo l'allungamento della catena peptidica (Stark GR et al, 1998; Cheney KM, McKnight Á, 2010).

I **virus Coxsackie** sono classificati in due gruppi: gruppo **A** (23 sierotipi) e gruppo **B** (6 sierotipi) a seconda dei cambiamenti istopatologici che producono in seguito ad iniezione intraperitoneale o sottocutanea in topini neonati: il gruppo **A** produce una **paralisi flaccida** dovuta a necrosi acuta dei miociti; il gruppo **B** (da "body") produce **paralisi spastica**, causa effetti meno gravi ma il danno prodotto interessa molti più organi, compresi cuore, pancreas, cervello, fegato e muscolo scheletrico (La Placa M et al., 2008).

I Cocksackie B sono caratterizzati da un genoma a RNA monocatenario con polarità positiva di circa 7-8 Kb, che codifica per quattro proteine strutturali principali. Il capside e' icosaedrico di 28-30 nm (La Placa M et al., 2008).

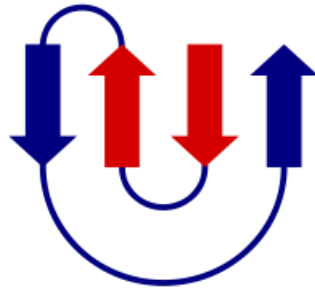
## 1.5 Meccanismo d' infezione dei virus cardiotropici

Le miocarditi ad eziologia virale sono il risultato dell'interazione tra processi virali e risposte immunitarie dell'ospite, quindi sia la risposta immunitaria innata che quella adattativa rappresentano fattori importanti nel determinare la severità del danno al miocardio (Lindner et al., 2009).

Il meccanismo patogenetico d'infezione del miocardio da Adenovirus ed Enterovirus non è ancora stato del tutto chiarito. Recenti studi riportano che il recettore "*Cocksackie and Adenovirus Receptor*" (*CAR*) e il *co-recettore* "*Decay-Accelerating Factor*" (*DAF-CD55*) permetterebbero il riconoscimento e l'adsorbimento del virus agendo sinergicamente (Bergelson JM et al., 1997; Tomko RP et al., 1997).

Il **recettore CAR** e' una proteina di 46 kDa espressa, tra l'altro, sulla superficie delle cellule cardiache. E' codificato dal gene **CXADR**, lungo 53 chilobasi e localizzato sul cromosoma 21. L'ortologo murino **cxadr** è localizzato sul cromosoma 16, è lungo 35 chilobasi e la proteina che codifica mostra l'80% di omologia con il cDNA del CAR umano (Verdino P et al, 2010; GeneBank). Esistono due isoforme del recettore, una delle quali possiede un dominio citoplasmatico di 94 amminoacidi (**CAR<sup>ex7</sup>**) e l'altra di 107 amminoacidi (**CAR<sup>ex8</sup>**). L'organizzazione del gene murino rispecchia quella del gene umano (Excoffon KJ et al, 2010). Presenta due domini extracellulari del tutto simili a quelli delle immunoglobuline pertanto viene considerato un membro di questa superfamiglia (Selinka HC et al, 2004). In questa famiglia sono inclusi recettori cellulari con funzione di adesione, co-recettori e molecole co-stimolatorie del sistema immunitario, molecole coinvolte nella presentazione dell'antigene ai linfociti (APC), recettori delle citochine e numerose proteine solubili delle fibre muscolari. I membri di questa famiglia sono accomunati dal possedere strutture

conservate nel dominio extracellulare in quanto tutti presentano un Ig-like domain (Terence SD et al, 2009). Il dominio distintivo delle Immunoglobuline mostra un caratteristico ripiegamento a “sandwich”, formato da 7 a 9 nastri  $\beta$  raggruppati in due foglietti  $\beta$  antiparalleli con topologia a “chiave greca” (Figura n. 8).



**Figura n. 8:** Motivo a chiave greca nella struttura delle proteine; *wikipedia.it*.

In condizioni normali si osserva un basso livello di espressione del recettore CAR sulla membrana plasmatica delle cellule cardiache, mentre una quantità più elevata dello stesso si ritrova a livello dei dischi intercalari, ovvero quelle regioni di massima importanza per l'integrità funzionale del cuore che lo rendono, per le loro particolari proprietà, un sincizio funzionale (Selinka HC et al., 2004). Nei tessuti adulti sono presenti sia l'isoforma  $CAR^{ex8}$  sia l'isoforma  $CAR^{ex7}$ ; entrambe permettono l'internalizzazione dei Coxsackievirus nelle cellule suscettibili in vitro e in vivo, ma hanno diversa localizzazione al livello cellulare (Excoffon KJ et al, 2010): nelle cellule polarizzate degli epiteli, nelle quali si distinguono funzionalmente una parte apicale dotata di strutture specializzate (come i microvilli dell'epitelio intestinale) e una parte basale che poggia su un connettivo a funzione trofica,  $CAR^{ex8}$  si localizza in maniera diffusa su tutta la superficie della membrana, mentre  $CAR^{ex7}$  si localizza specificamente al livello della membrana basolaterale, in particolar modo sulle giunzioni strette. Anche nel cuore umano e murino adulto è stata rilevata l'espressione di entrambe le isoforme, e  $CAR^{ex7}$  è localizzata prevalentemente nei dischi intercalari interposti tra i cardiomiociti (Shaw AC et al, 2004). L'espressione di CAR è necessaria e

sufficiente perché avvenga l'internalizzazione dei Cocksackievirus nei cardiomiociti umani e murini (Tomko PR et al, 1997). L'adsorbimento dei virus alla cellula avviene tramite il legame del canyon virale ai domini immunoglobulinici del recettore CAR (Mariscal LG et al, 2009).

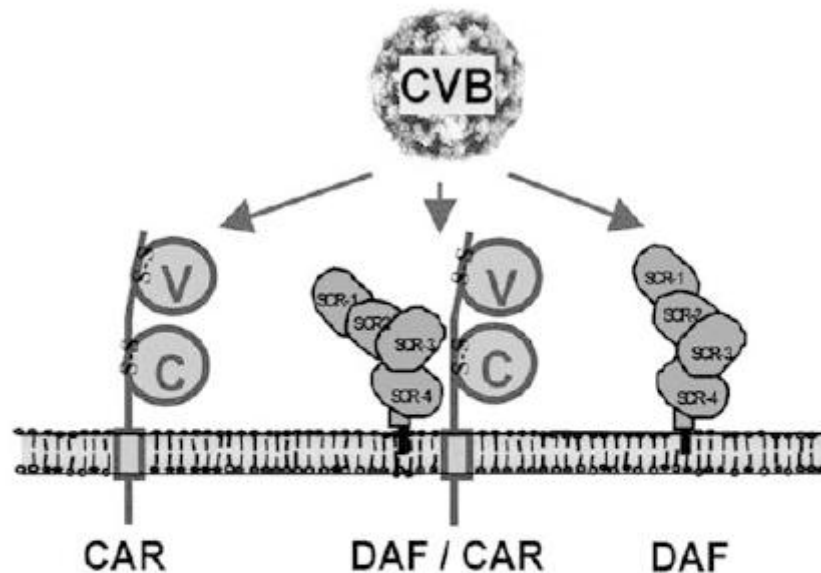
Molti studi dimostrano come l'espressione del gene che codifica per il recettore CAR sia upregolata nel tessuto cardiaco di pazienti affetti da insufficienza cardiaca dovuta a CMD; tale sovraespressione proteica potrebbe contribuire al rafforzamento della diffusione del virus, amplificando ulteriormente la malattia infiammatoria miocardica (Selinka HC et al., 2004).

Il **co-recettore DAF** è una proteina regolatoria del complemento di 70 kDa ed è abbondantemente espressa a livello delle cellule epiteliali ed endoteliali (Selinka HC et al., 2004). Sono note due principali forme del DAF, frutto di splicing alternativo, una delle quali è una proteina di membrana e l'altra una proteina solubile, espressa a livelli inferiori rispetto alla prima (Osuka F et al, 2006). La proteina di membrana si inserisce nel doppio strato di fosfolipidi grazie ad un'ancora di glicofosfatidilinositolo (GPI), e presenta quattro domini extracellulari in grado di legare le proteine C1-C6 del sistema del complemento, effettori della lisi osmotica dei patogeni e delle cellule riconosciute come estranee o pericolose (Williams P et al, 2003). La proteina DAF è un recettore di membrana, sfruttato anche dai Cocksackievirus per l'internalizzazione nelle cellule suscettibili (Bergelson JM et al, 1994), e l'espressione sulla membrana eritrocitaria è connessa alla funzione regolatoria del recettore sul sistema del complemento: DAF è in grado di inibire l'assemblaggio dell'enzima C3 convertasi in assenza di patogeni, proteggendo le cellule dalla lisi autologa (Uhrinova S et al, 2003). A qualunque via di attivazione sia soggetto il sistema del complemento, evento comune e indispensabile è la formazione precoce del complesso enzimatico **C3 convertasi**. In questo quadro si inserisce l'azione fondamentale della proteina DAF, che interviene nella via classica e in quella alternativa del sistema del complemento prevenendo la lisi delle cellule autologhe,

rendendole riconoscibili come “self” da parte del sistema immunitario (Harris CL et al, 2007).

Data la sua espressione sulla superficie apicale delle cellule endoteliali, DAF risulta coinvolto nella diffusione dell'infezione virale ai differenti organi bersaglio; il co-recettore potrebbe potenziare l'ingresso del virus nel cuore ed amplificare la successiva diffusione dell'infezione ad altri organi (Selinka HC et al, 2004), ma non è indispensabile per l'interazione e penetrazione del virus per la cui azione è sufficiente la sola presenza del recettore CAR, sebbene pare che il primo contatto del virus sia con il DAF.

E' stato dimostrato che il recettore CAR e il co-recettore DAF presentano una stretta associazione spaziale a formare un “*CAR-DAF Receptor Complex*” che, per la sua collocazione sulla superficie apicale delle cellule, permetterebbe un'efficiente internalizzazione e diffusione virale sia in senso verticale che orizzontale all'interno del tessuto (Selinka et al., 2004) (Fig. n.9).

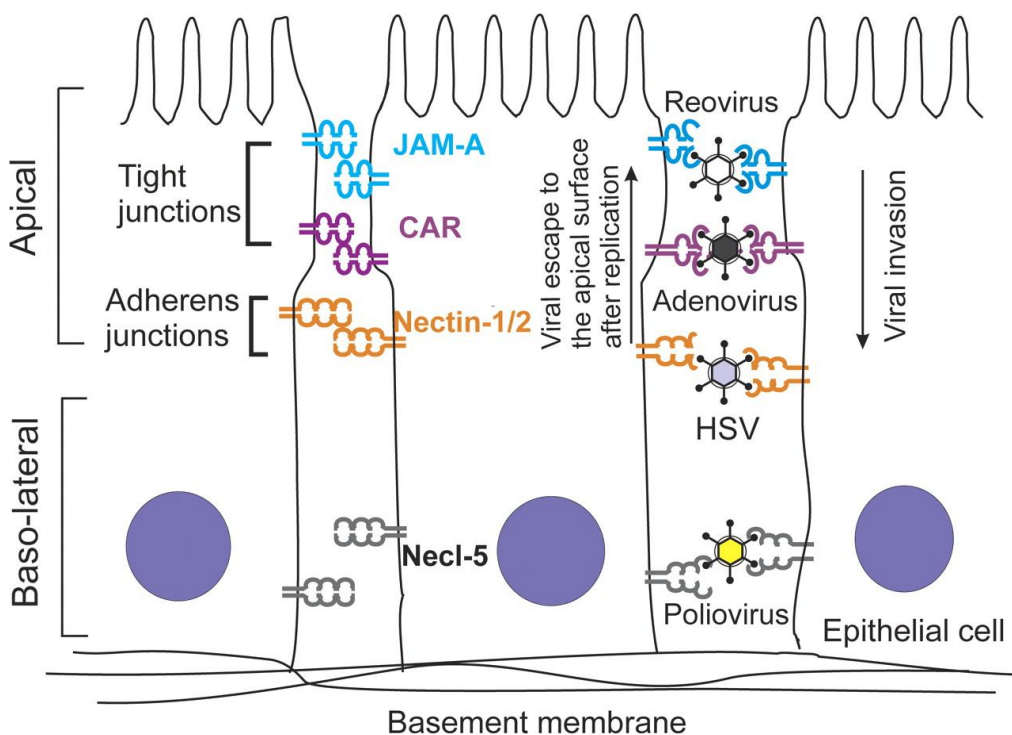


**Fig. 1** Schematic diagram of CVB-receptor interactions. CVB preferentially interacts with two cell surface proteins, the CAR and DAF/CD55. Cooperating CAR and DAF molecules may form a functional DAF/CAR receptor complex (*CVB* coxsackie B virus, *CAR* coxsackievirus-adenovirus receptor, *DAF* decay-accelerating factor)

**Fig n. 9** CAR/DAF receptor complex (Selinka et al.,2004)

Oltre all'associazione sinergica con il recettore CAR, il co-recettore DAF sarebbe coinvolto nella diffusione dell'infezione virale ai differenti organi bersaglio secondari poiché risulta espresso sulla superficie apicale delle cellule endoteliali. Infatti, è proprio in relazione alla distribuzione del corecettore DAF a livello tissutale, che si ha un effetto amplificato del virus (Selinka HC et al., 2004).

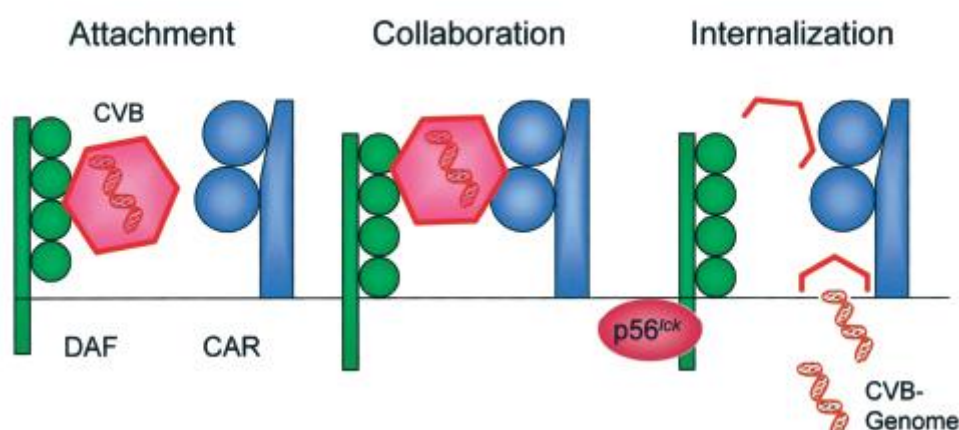
L' infezione da Enterovirus diffonde a gli organi secondari perchè il virus attraversa molto efficacemente numerosi strati di cellule epiteliali del tratto gastrointestinale o del tratto respiratorio nel corso dell'infezione sistemica (Selinka HC et al., 2004). Come noto, i tessuti epiteliali sono caratterizzati dalla presenza di cellule polarizzate contigue, unite le une alle altre mediante giunzioni strette, le quali poggiano su una lamina basale sintetizzata dalle stesse cellule. E' stato recentemente dimostrato che sulle cellule epiteliali polarizzate l'espressione delle proteine CAR è limitata a tali giunzioni strette, a livello delle quali si trova una proteina strutturale che funziona da recettore virale: la molecola di adesione giunzionale (JAM) (Figura n.10) , ovvero il recettore per Reovirus (Selinka HC et al., 2004) .



**Fig. n. 10** Localizzazione del recettore CAR sull'epitelio-*medical.net*



Grazie alle interazioni specifiche dei Reovirus con JAM e dei Coxsackie virus e Adenovirus con il recettore CAR, i membri di queste tre famiglie di virus utilizzano le giunzioni strette per superare la stretta barriera dell' epitelio gastrointestinale. Poiché CAR è espresso solo nelle giunzioni strette basolaterali, tale recettore non è facilmente accessibile al virus. La proteina DAF è abbondantemente espressa sulla superficie apicale delle cellule e può fornire il primo contatto con il virus (Liu et Opvasky 2000) (Figura n.11).



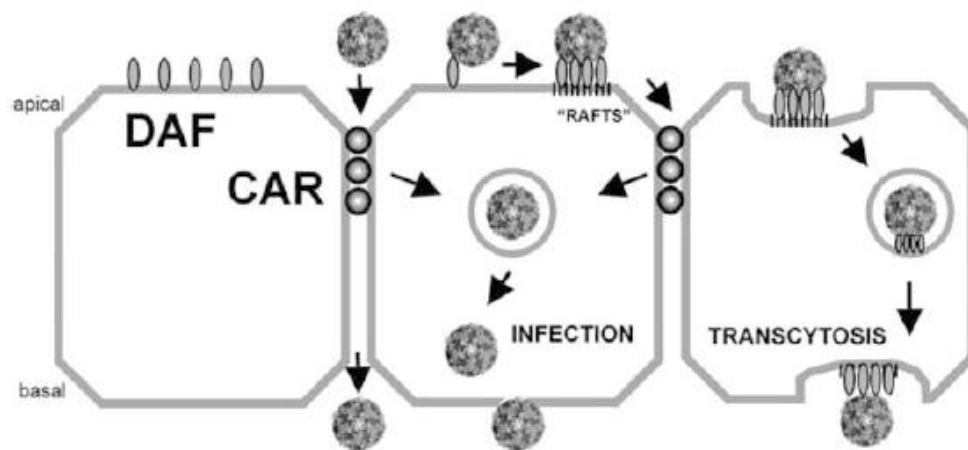
**Fig. n. 11** (Liu et Opvasky 2000)

Secondo recenti studi il CAR-DAF Receptor Complex consentirebbe la penetrazione del virus nelle cellule anche attraverso transitosi (Selinka HC et al., 2004), un tipo di pinocitosi utilizzata dagli organismi pluricellulari per trasportare selettivamente macromolecole tra due ambienti delimitati da una cellula polarizzata, ad esempio tra la superficie apicale e basolaterale di una cellula epiteliale.

In particolare, il processo della transitosi presenta delle tappe in comune con l'endocitosi clatrina-dipendente. Le vescicole endocitotiche, infatti, una volta perso il rivestimento di clatrina, si fondono con particolari endosomi apicali (o basolaterali), gli endosomi di smistamento apicali (o basolaterali), i quali trasferiscono il materiale a endosomi riciclatori basolaterali (o apicali). Questi si

fondono con la membrana basale o apicale e riversano le macromolecole nel versante opposto basale (o apicale) (Alberts B et al., 2009).

E' già stato evidenziato in precedenza il fatto che un virus cardiotropico debba attraversare un gran numero di differenti cellule e tessuti, che esprimono ciascuno particolari e specifiche proteine recettoriali, prima di raggiungere la destinazione finale delle cellule cardiache, i miociti. Le barriere epiteliali e quelle endoteliali possono dunque essere superate attraverso un'infezione virale o mediante transitosi del virus (Figura n.12).



**Fig. n. 12** Transitosi (Selinka et al., 2004)

Una ri-espressione della proteina CAR è stata ben documentata in molte patologie cardiache, quali le miocarditi virali, e potrebbe essere interpretata come un pattern di ri-espressione embrionale che è stato infatti accertato per molte proteine coinvolte nelle patologie cardiache gravi. Questa ri-espressione del recettore CAR causerebbe un riassortimento strutturale del miocardio e soprattutto aumenterebbe la suscettibilità all'infezione virale (Poller W et al., 2002).

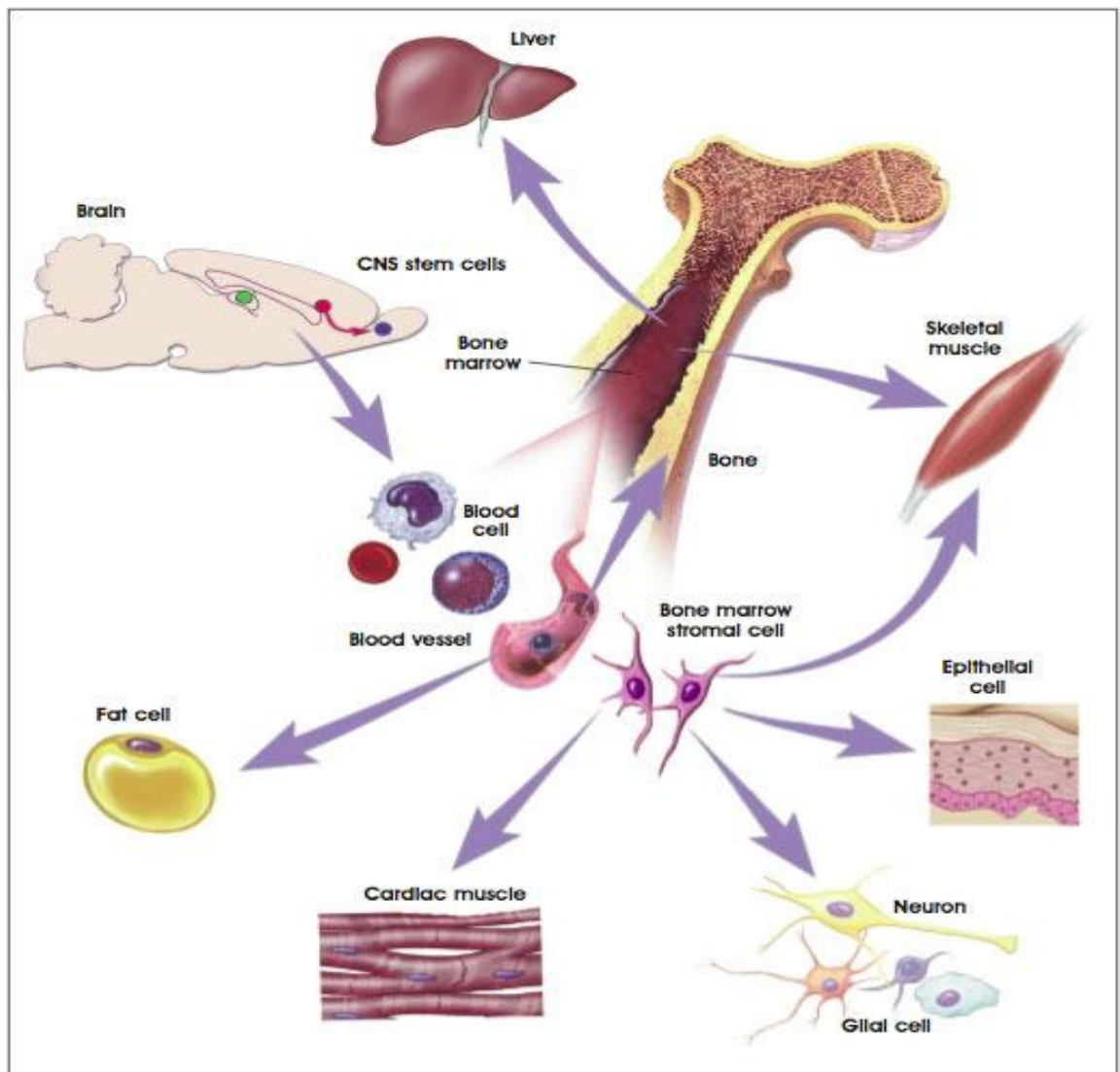
## 1.6 Terapie

Nonostante i continui progressi raggiunti negli ultimi anni nella conoscenza dei meccanismi molecolari e cellulari della fisiopatologia cardiaca, ad oggi, mancano trattamenti farmacologici risolutivi in grado di preservare le cellule cardiache contrattili danneggiate durante l'infarto. Pertanto le uniche soluzioni possibili per curare questa patologia sono il trapianto d'organo o l'impianto di cellule staminali (Forte G et al., 2009).

Il trapianto del muscolo cardiaco è difficilmente attuabile nella maggior parte dei soggetti infartuati per la difficoltà a reperire organi disponibili e allo stesso tempo compatibili con il ricevente. È elevato infatti il rischio di rigetto, che può presentarsi in forma acuta dopo i primi mesi, caratterizzato da considerevoli infiltrati linfocitari nel tessuto cardiaco, oppure in forma cronica, che compare negli anni successivi al trapianto come una lesione progressiva dei vasi di irrorazione del cuore (Crea F, Malattie del cuore, 2007). Altri fattori possono pregiudicare l'esito operatorio di un trapianto, quali infezioni sistemiche attive, malattie metaboliche, neoplasie, insufficienza renale, insufficienza epatica, ipertensione arteriosa, età. L'impianto di cellule staminali adulte potrebbe rappresentare un approccio terapeutico innovativo per curare la patologia cardiaca e sopperire al trapianto d'organo (Forte G et al, 2009). Particolare attenzione è rivolta alle cellule staminali del midollo osseo (figura 13). Nel midollo, oltre alle cellule staminali che sostengono l'ematopoiesi (Hematopoietic staminal cell, HSC), esiste una sottopopolazione di cellule definite mesenchimali (Mesenchimal Staminal o Marrow Stromal Cells, MSC), scoperte nel 1973 da Friedenstein e che studi recenti hanno dimostrato trovarsi anche nei tessuti adulti (Schipani E, Kronenberg HM, 2009). Le cellule mesenchimali hanno delle enormi potenzialità di "self- renewal" e grande plasticità: a seconda degli stimoli differenti che ricevono in vivo o in vitro possono differenziarsi in osteoblasti, adipociti, condrociti o miociti.

Il midollo osseo viene isolato nell'uomo mediante ago-aspirato e successivamente centrifugato con Percoll (WU JY et al, 2006) , mentre nel topo viene isolato mediante frantumazione meccanica delle ossa e successiva digestione con

collagenasi (XU S et al, 2006); le MSC vengono poi distinte e separate dalla componente ematopoietica grazie a specifici marcatori di superficie delle cellule staminali (SCA-1, CD90, CD105 e CD73) e/o in base a caratteristiche di crescita: al contrario delle HSC proliferano in adesione e non in sospensione (XU S et al, 2010).



**Fig. n. 13** mesenchimal stem cells; *stemcells.nih.gov*.

Vari studi, infatti, hanno focalizzato l'attenzione sulle cellule staminali mesenchimali del midollo osseo umano (hMSCs) ritenendole ottime candidate per la terapia cellulare e l'ingegneria tissutale (Huang G et al., 2008; Abdallah BM et al., 2005). Le hMSCs rappresentano pertanto una popolazione di cellule staminali in grado di differenziarsi, sotto particolari condizioni, in molteplici tipi cellulari. E' stato osservato che queste cellule vanno incontro a senescenza in relazione all'arresto del loro ciclo di crescita e mostrano anche variazioni fenotipiche quando sono propagate in coltura per molto tempo (Abdallah BM et al., 2005). E' stato dimostrato che il gene che codifica per la subunità catalitica della telomerasi umana (hTERT) può prolungare la durata della vita delle hMSCs e mantenere il loro potenziale di differenziamento osteogenico (Huang G et al., 2008). Al fine di dimostrare l'enorme potenzialità di tali cellule, è stata allestita una linea di hMSCs trasdotta con hTERT esogeno (hTERT-hMSCs); da questa coltura madre sono state ottenute varie subcolture le quali, sotto induzione adipogenica, condrogenica e osteogenica, ciascuna si è differenziata rispettivamente in adipociti, condrociti ed osteociti. Le analisi del cariotipo non hanno mostrato significative anomalie a livello cromosomico nelle hTERT-hMSCs, né queste cellule hanno sviluppato tumori quando sono state impiantate in topi non affetti da SCID (Huang G et al., 2008).

Quindi l'introduzione della subunità catalitica della telomerasi nelle hMSCs mantiene il fenotipo delle cellule staminali; in questo modo e' possibile ottenere un numero sufficiente di cellule da utilizzare per studi meccanicistici del differenziamento cellulare e per i protocolli di ingegneria dei tessuti.

L'attenzione non è stata rivolta solamente alle cellule staminali mesenchimali del midollo osseo ma anche ad altri tipi cellulari differenziati. Allo scopo di verificare se sia possibile generare in vitro, da differenti tessuti umani adulti, popolazioni di cellule che si comportino, in coltura, come cellule staminali multipotenti (Beltrami AP et al., 2007), sono state propagate in coltura linee cellulari ottenute da vari organi, tra i quali fegato umano adulto, cuore e midollo osseo. Le cellule ottenute dai tre differenti tessuti hanno espresso fattori di trascrizione specifici dello stato di pluripotenza, hanno mostrato attività telomerasica e mantenuto un contenuto diploide di DNA. Inoltre, è stato evidenziato come tali cellule

condividessero un comune pattern di espressione indipendentemente dal tessuto dal quale erano state isolate. Tali risultati dimostrano come sia possibile ottimizzare un protocollo in vitro per generare ed espandere cellule da molti organi che potrebbero essere indotte ad acquisire le caratteristiche morfologiche e funzionali di particolari cellule mature, anche non connesse al tessuto di origine.

La terapia cellulare con impianto di cellule staminali adulte, con capacità di generare nuovi cardiomiociti, potrebbe quindi rappresentare un approccio risolutivo per rimpiazzare i cardiomiociti danneggiati irreversibilmente in seguito all'infarto (Forte G et al., 2009). In particolare, le osservazioni descritte in precedenza in relazione alle cellule staminali mesenchimali umane possono essere ritenute valide anche per le cellule staminali mesenchimali murine. Recenti lavori, infatti, hanno focalizzato l'attenzione su una linea cellulare staminale mesenchimale murina (mTERT-MSC) ottenuta mediante trasfezione delle MSC con la subunità catalitica della telomerasi murina (Forte G et al., 2009). Tale linea cellulare manteneva la capacità tipica delle cellule staminali mesenchimali di auto rinnovarsi, ed esprimeva continuamente caratteristiche fenotipiche proprie delle MSC. Inoltre, le cellule mTERT-MSC conservavano le caratteristiche funzionali delle MSC appena isolate in coltura, senza manifestare segni di senescenza o eventi di differenziamento spontaneo.

Una linea ingegnerizzata C-TERT è stata recentemente ottenuta dalle cellule cardiache del ceppo murino Mus musculus strain C57BL (Istituto di Cardiologia Molecolare e Cellulare, Roma Tor Vergata). Queste linee cellulari mantengono elevato il potenziale rigenerativo ed esprimono continuamente fattori di trascrizione e caratteristiche fenotipiche proprie dello stato di pluripotenza; inoltre, le cellule mantengono un contenuto diploide di DNA, hanno un comune pattern di espressione genica, indipendente dal tessuto di provenienza, e grazie all'induzione dell'attività telomerasica mediante trasfezione del gene che codifica la subunità catalitica dell'enzima non manifestano segni di senescenza o eventi di differenziamento spontaneo (Forte G et al, 2009). Tali risultati dimostrano come sia possibile elaborare un protocollo in vitro per selezionare ed espandere, da

diversi organi, cellule staminali adulte che potrebbero essere indotte ad acquisire caratteristiche morfologiche e funzionali di cellule mature, connesse o meno al tessuto di provenienza. L'ottimizzazione di una terapia cellulare, che preveda l'impianto di cellule staminali cardiache adulte con capacità di generare nuovi cardiomiociti, potrebbe rappresentare un approccio risolutivo per rimpiazzare le cellule irreversibilmente danneggiate durante l'infarto ( Cook MM et al, 2008; Forte G et al, 2009).

## 1.7 Sensibilità alle infezioni

Le malattie infettive virali rappresentano una delle maggiori cause di morte nei paesi industrializzati, perciò l' identificazione delle varianti genetiche che modulano la suscettibilità alle infezioni costituisce un elemento fondamentale nella ricerca di nuovi approcci terapeutici e farmacologici curativi e preventivi. I virus hanno contribuito a modellare la variabilità genetica umana, aumentando o, talvolta, diminuendo la predisposizione alle infezioni.

Analisi genetiche e bioinformatiche rivelano che il genoma di moltissimi mammiferi, compreso l'uomo, contiene numerosi **“endogenous viral elements”** o **EVEs** (Katzourakis A, Gifford R, 2010), ossia veri e propri “fossili molecolari” di antichi virus, retaggio di antiche infezioni e soggetti a milioni di anni di evoluzione. Nel genoma dei mammiferi, la maggior parte degli EVEs deriva da retrovirus, che si integrano nel genoma dell'ospite proprio per le peculiarità del loro ciclo vitale, che prevede un passaggio di retrotrascrizione da RNA a DNA; meno diffusi, ma ugualmente riscontrabili, sono EVEs derivati dall'integrazione di virus non retrovirali mediante la ricombinazione omologa con il DNA genomico dell'ospite. Durante il processo evolutivo, questi virus si sono integrati nelle linee germinali delle specie infettate, e si sono trasmessi fino ai giorni nostri in maniera del tutto silente o determinando un certo grado di variabilità genetica. Un esempio lampante è costituito dal gene **EBNL-1** del **bornavirus**, integratosi stabilmente nel genoma dei primati moderni (Johnson We, 2010). Questo gene codifica una proteina che si mostra in grado di riconoscere l' RNA virale della sua

stessa famiglia e di difendere le cellule da possibili sovra infezioni, degradandolo, mentre non influenza in altro modo la fisiologia dell'ospite. Esiste quindi una complessa relazione evolutiva tra i virus e il genoma dell'organismo infettato, sottoposto ad una costante pressione selettiva e costretto ad adattarsi e modificarsi in maniera plastica per rispondere attivamente alle infezioni virali.

L'andamento di malattie infettive causate da diversi microrganismi è influenzato in modo sostanziale dalla variabilità genetica dell'ospite, in relazione soprattutto ai meccanismi di difesa, e fa riferimento ad una variabilità poligenica nella diversa suscettibilità dei vari individui e delle varie popolazioni (Veliov VM 2005; Abdel-Azim GA et al., 2005). E' noto che esistono soggetti geneticamente resistenti alle infezioni.

Per alcune infezioni, come la lebbra, la malattia è riferita a gruppi familiari, ma spesso è difficile stabilire l'importanza relativa della vicinanza ad un caso indice e dei geni condivisi. Tuttavia, l'aumentato rischio di malattia in fratelli rispetto alla popolazione generale è un indice utile di importanza della componente genetica in una malattia multifattoriale (Weeks DE et al., 1995) e sembra incrementato di 1.5-5 volte a seconda delle diverse malattie infettive.

Studi su gemelli omozigoti hanno dimostrato una più alta concordanza di infezione rispetto a gemelli eterozigoti sia per tubercolosi che per lebbra, per malaria, per *Helicobacter pylori*, per poliomielite e per infezioni persistenti da virus dell'epatite B.

In generale, è stato relativamente più facile dimostrare che i fattori genetici svolgono un ruolo significativo nelle infezioni in cui solo una proporzione di soggetti infetti sviluppano malattia di tipo cronico anziché acuto e nella severità delle infezioni piuttosto che dimostrare il ruolo svolto dai fattori genetici nella suscettibilità alle infezioni stesse.

Recenti studi incentrati sulle mutazioni puntiformi del genoma o **SNPs** (*single nucleotide polymorphism*) di 52 popolazioni distribuite in tutto il mondo, e un confronto con i virus diffusi nelle rispettive regioni geografiche di provenienza, ha permesso di scoprire in 139 geni oltre 400 differenti mutazioni che aumentano fortemente il rischio delle persone di contrarre i virus esaminati (Fumagalli M et



al, 2010). Per individuare i diversi alleli di suscettibilità, i geni in esame nelle popolazioni sono stati confrontati con l' HGP-CEPH , Human Genome Diversity Cell Line Panel: una collezione di 1064 campioni di DNA provenienti da individui distribuiti in tutto il mondo e resi pubblici proprio per permettere lo studio delle variazioni genetiche (Rosemberg NA, 2006).

## **1.8 Resistenza alle infezioni da HIV, HCV, HBV, CMV**

Per produrre malattia questi virus devono entrare nell'ospite, moltiplicarsi nella zona di penetrazione e nei tessuti, diffondersi dal sito di ingresso ed evadere o sopraffare la risposta immune. A ciascuno stadio del processo infettivo geni specifici dell'agente infettante e geni dell'ospite determinano la virulenza del virus stesso. Ciascuna di queste tappe può incontrare resistenza da parte dell'assetto genetico dell'ospite e pertanto tali virus non riescono a causare infezione, ad esprimere i loro geni e quindi non producono progenie virale infettante e infine non provocano evasione/sopraffazione del sistema immune.

### **Resistenza all'infezione da virus HIV**

Da tempo è noto che un polimorfismo autosomico dominante, CCR5Delta32, è compatibile con le funzioni immunologiche umane normali, ma incompatibile con l'ingresso dell'HIV nelle cellule competenti. In particolare, lo stato omozigote rende il soggetto refrattario all'infezione da HIV, nonostante ripetute esposizioni (questo polimorfismo è presente nei caucasici in circa il 5% dei soggetti), mentre lo stato di eterozigosi rende "long term survivors" (i soggetti sono infetti ma la loro progressione clinica è molto più lenta rispetto alla controparte recessiva omozigote, per la difficoltà che il virus incontra a diffondersi nell'organismo) (Julg B et Goebel FD 2005; Li M et al., 2005). La selezione e l'inoculo di cellule staminali midollari portatrici del polimorfismo CCR5Delta32 omozigote potrebbe essere utile nei soggetti in trattamento per linfoma aggressivo, in cui è già riconosciuta la validità del trapianto midollare nel trattamento dell'aplasia

midollare da chemioterapia aggressiva (Krishnan A et al., 2005) e potrebbe essere proposto nelle fasi più gravi dell'immunodeficienza stessa.

Altre ricerche sulla refrattarietà all'infezione virale sono in corso per comprendere la mancata trasmissione di HIV tra partners sessuali non concordanti; una delle possibili cause potrebbe essere rappresentata prevalentemente dalla variabilità di alcuni parametri, quali suscettibilità linfocitaria al virus, immunità cellulo-mediata o produzione di interferone gamma, piuttosto che a caratteristiche genetiche virali (Bienzle D et al., 2000).

E' stato messo in evidenza, inoltre, che l'omozigosi per l'aplogruppo CCR2b-64I potrebbe procurare resistenza all'infezione da HIV in prostitute esposte per lungo termine ad HIV in Tailandia (Yang C et al., 2003); questo studio richiede comunque conferma con soggetti con assetto genetico diverso.

L'infezione da HIV è stata considerata per molto tempo una controindicazione assoluta al trapianto d'organo. Tuttavia, in considerazione dell'ottima risposta clinica alla terapia combinatoria precoce ad alte dosi ed alla conseguente buona aspettativa di vita, è aumentata l'esigenza di trapianto d'organo. Pertanto, sono stati eseguiti trapianti per varie patologie:

- miocardiopatia cronica: trapianto cardiaco (Calabrese LH et al., 2003);
- insufficienza renale: trapianto di rene (Roland ME et al., 2003);
- linfoma aggressivo: trapianto di cellule staminali emopoietiche;
- insufficienza epatica in HCV positivi: trapianto di fegato (Molina A et al., 2003).

Lo studio di tutti i fattori di resistenza all'infezione virale da HIV potrebbe costituire un passo importante nel controllo dell'infezione qualora i soggetti che necessitassero di trapianto di cellule staminali midollari, che si differenziano in progenitori emopoietici, potessero avere infuse cellule staminali resistenti ad HIV nel midollo. La selezione e l'inoculo di cellule staminali midollari, portatrici del polimorfismo CCR5Delta32 omozigote che le rende resistenti ad HIV, sono stati determinanti nella cura dei soggetti affetti da aplasia midollare, causata dalla chemioterapia nel trattamento del linfoma aggressivo (Krishnan A et al, 2005). In

futuro il trapianto midollare potrebbe diventare un gold standard nella cura dell'AIDS persino nelle sue fasi più gravi, se quanti necessitassero di trapianto di cellule staminali midollari, che si differenziano in progenitori emopoietici, potessero ricevere per "infusione" nel midollo cellule staminali totalmente resistenti all'HIV.

## **Resistenza ad HCV**

L'infezione da virus dell'epatite C può essere asintomatica, autolimitante o persistente (come avviene nella maggior parte dei soggetti infetti); HCV è responsabile di un vasto spettro di lesioni epatiche croniche che variano dalla minima infiammazione alla cirrosi od al carcinoma epatocellulare (Hoofnagle JH, 2002). Manifesta un marcato tropismo per il fegato, poiché, dopo essere entrato nel torrente circolatorio ematico, l'HCV si lega prevalentemente a recettori epatici quali lipoproteine a bassa densità (LDL).

Studi epidemiologici suggeriscono che nei soggetti con infezione persistente (circa l'80%) la cirrosi può svilupparsi anche dopo circa 20 anni dal contagio e l'insufficienza epatica e la neoplasia possono manifestarsi generalmente anche dopo 28-30 anni. In alcuni pazienti il tasso di progressione è mediamente molto rapido, mentre in altri è molto lento. Inizialmente questa diversità è stata imputata alla variabilità virale, ma non esistono evidenze che il genotipo virale influenzi direttamente la guarigione dall'infezione. Inoltre, sono state riportate in letteratura varie prove conflittuali sulla possibilità che il genotipo virale influenzi l'avanzare della fibrosi in soggetti con infezione persistente.

Fattori ambientali e dell'ospite sembrano essere più importanti del genotipo virale riguardo l'evoluzione in fibrosi. Il sesso maschile, il consumo eccessivo di alcool, l'acquisizione dell'infezione dopo i 40 anni sono tutti fattori che sembrano essere associati ad una fibrosi più severa (Bowen DG et Walker CM, 2005). Diversi studi hanno mostrato che la risposta linfocitaria T agli antigeni HCV differisce quantitativamente e qualitativamente tra i soggetti che spontaneamente guariscono dall'infezione e quelli che hanno infezione persistente e differisce anche tra le

persone che rispondono alla terapia con interferone rispetto a quelle che non rispondono. A tale proposito è stata molto studiata l'influenza del genotipo MHC di classe II sull'evoluzione dell'infezione anche se i lavori che riconoscono che alleli specifici siano associati ad evoluzioni cliniche specifiche non sono sempre consistenti (Thursz M et al., 1999).

In mancanza di studi su gemelli omozigoti, soltanto l'evidenza circostanziale sostiene l'ipotesi secondo cui l'assetto genetico dell'ospite contribuisca all'evoluzione clinica dell'infezione da HCV. Quindi, i meccanismi che sono alla base della guarigione e della persistenza di malattia devono, ancora oggi, essere sostanzialmente identificati (Yenigun A et Durupinar B, 2002).

I possibili meccanismi di induzione dell'epatocarcinoma (HCC) da parte del virus HCV sono ancora poco conosciuti, ma alla loro base si trovano certamente l'elusione della risposta immunitaria mediante l'ipervariabilità antigenica e probabilmente l'azione diretta della proteina virale NS5, che conferisce resistenza all'interferone e inibisce l'apoptosi nelle cellule infettate. Analisi di microarray di HCC suggeriscono inoltre una sovra-regolazione di geni coinvolti nella crescita cellulare (Ciclina CDC20, CDK4, Myb) e una regolazione differenziale di geni coinvolti nella cascata di trasduzione del segnale ( $\beta$ -catenina, metallo proteinasi) (Bassiouny AE et al, 2010). Sia nell'uomo sia nel modello murino, recenti ricerche hanno chiarito il ruolo dei linfociti CD8<sup>+</sup> nella clearance dell'HCV, evidenziando però come, nei casi di infezione virale persistente causata dalla variabilità antigenica, l'attivazione incontrollata del sistema immunitario contribuisce ad un danno immunopatologico costante che influenza la patogenesi del carcinoma o porta alla completa distruzione del tessuto epatico (Philpp Al et al, 2010).

## **Resistenza all'infezione da HBV**

Anche l'infezione da HBV causa, in soggetti diversi, un quadro di infezione polimorfico che va dallo stato di portatore asintomatico (epatite criptica), all'epatite acuta, all'epatite cronica, fino alla cirrosi epatica ed al carcinoma

epatocellulare. Questa variabilità di evoluzione clinica dell'infezione è riconducibile a varie cause che comprendono fattori virologici, fattori immunologici dell'ospite e fattori genetici della cellula epatica dell'ospite, nonché l'incontro con gli antigeni virali (Kacprzak-Bergman et al., 2005).

Sono in corso di studio i fattori genetici dell'ospite possibilmente coinvolti nel processo di infezione da HBV quali: geni che mediano il processo di ingresso virale negli epatociti (coinvolti nell'aggancio virale, nella fusione alla membrana cellulare e nel trasporto intracellulare), geni che modulano o controllano la risposta immune all'infezione da HBV, geni che partecipano alle alterazioni patologiche del tessuto epatico ed infine geni coinvolti nello sviluppo della cirrosi epatica e del carcinoma epatocellulare. Alcuni alleli del sistema HLA di classe II sono associati in modo non conclusivo alla manifestazione clinica dell'epatite acuta o cronica quali: DRD1\*1302 o HLA DR13 o DQA1\*0501-DQB1\*0301-DQB1\*1102. Polimorfismi nei geni che codificano per le proteine che legano il mannosio (MBP) sono stati coinvolti nell'infezione cronica. Altri polimorfismi genici sono stati candidati e diversi polimorfismi di singoli nucleotidi potrebbero contribuire alla protezione dall'infezione cronica in combinazione o sinergia (Kim YJ et Lee HS, 2005).

Coorti di pazienti con diverse situazioni cliniche di infezione da HBV devono essere studiate per comprendere la complessa partecipazione dei fattori genetici dell'ospite (Wang FS, 2003).

## **Resistenza all'infezione da CMV**

Il Citomegalovirus appartiene alla famiglia Herpesviridae e, in quanto tale, è sospettato di essere oncogeno; l'infezione da CMV è infatti candidata come possibile co-fattore nello sviluppo di tumore della cervice uterina causato dal papillomoma virus 16 (HPV16) (Szostek S et al, 2009). Dati in letteratura evidenziano anche la connessione tra la sieropositività al CMV e numerose malattie cardiovascolari ad alto tasso di mortalità (Simanek Al et al, 2011). L'infezione è spesso asintomatica (sia primaria, sia ricorrente), o con sintomi modesti: febbre persistente, astenia, mialgia, adenomegalia, linfadenopatia

(prima simil mononucleosica). Sono sede di infezione primaria multipla le cellule epiteliali, le mucose, i linfonodi; dopo l'infezione primaria il CMV rimane in forma latente per tutta la vita nel sangue periferico, nell'epitelio dei tubuli renali e nell'epitelio delle ghiandole salivari.

L'infezione da herpesvirus 5, CMV, è la causa più frequente di morbidità e di rigetto di trapianto di organo solido. Anche se nessuna influenza genetica diretta sulla predisposizione all'infezione da herpesvirus CMV è stata riportata, studi su soggetti trapiantati di rene indicano che fattori dell'ospite influenzano il tipo di infezione, che varia dal 34 al 64% dell'infezione primaria contro un 8% di incidenza di infezione sintomatica (Ho M, 1994).

La reattività delle cellule Natural Killer (NK) nell'infezione in vitro e in studi caso-controllo in vivo sembra svolgere un ruolo importante e potrebbe essere attribuibile, nell'uomo, ad un gene putativo, CMV1, omologo di un CMV1 murino già identificato sul cromosoma 6 in mappe di "linkage" genetico (Depatie C et al., 1997). L'attivazione del recettore delle NK, Ly-49H, è criticamente coinvolta nella resistenza al CMV murino in vivo; esso richiede una sequenza immunorecettoriale attivabile dalla tirosina (ITAM) che contenga una molecola transmembrana per l'espressione e la traduzione del segnale (Brown MG et al., 2001). Sono in corso studi per identificare il suo omologo umano.

## 1.9 Geni coinvolti nella suscettibilità alle malattie infettive

Sono stati applicati diversi approcci fra loro complementari per identificare i geni coinvolti nella suscettibilità a malattie infettive:

- analisi degli **SNPs** (*single nucleotide polymorphism*) di varie popolazioni distribuite al livello mondiale per verificare l'associazione tra mutazioni puntiformi e relativi outcome (Fumagalli M et al, 2010; Rosenberg NA, 2006);
- analisi dei geni candidati in studi di “caso-controllo”: la frequenza di varianti geniche sospette di avere ruolo nella suscettibilità alle infezioni o nella patogenesi delle malattie è più alta nei “casi” rispetto agli individui sani, ovvero ai “controlli” (Conti G, Terapia intensiva, 2007);
- analisi di associazione **semplice** a malattie infettive in studi di famiglie affette/non affette e analisi di linkage in studi di individui non imparentati, per la comprensione delle malattie “multi-loci” **complesse** (Conti G, Terapia intensiva, 2007);
- analisi di ricombinazione dei geni di suscettibilità condotte su animali da esperimento: questi studi hanno come scopo l'identificazione della controparte umana dei geni conresponsabili delle patologie in esame (Klug WS, Concetti di genetica, 2007);
- knockout sperimentale per verificare gli effetti delle mutazioni nulle in geni candidati nella suscettibilità alle infezioni; anche questi studi contribuiscono all'identificazione della controparte umana dei geni in esame (Klug WS, Concetti di genetica, 2007);

- analisi dei geni connessi all'immunità o alla resistenza innata alle infezioni (De Souza PR et al, 2007; Picton AC, 2010).

## 2. Scopo

L'infarto del miocardio esita in fibrosi e non in rigenerazione tissutale. In caso di associazione a cardiomiopatia infettivo-virale, l'effetto citopatico causato dai Cocksackievirus potrebbe interessare non soltanto i cardiomiociti adulti, ma anche le cellule staminali cardiache residenti, una cui compromissione fornirebbe una valida spiegazione della mancanza di self-renewal delle cellule cardiache per sopperire alla necrosi tissutale. Date tali premesse e considerando che :

- soggetti diversi hanno evoluzione diversa di alcune infezioni e molti risultano resistenti (coppie di partners discordanti di cui un soggetto positivo);
- l'espressione transitoria del recettore CAR modifica la suscettibilità alle infezioni con virus Cocksackie ed Adenovirus;
- la specie *Mus musculus* strain C57BL risulta suscettibile all'infezione con virus Cocksackie B (Leipner C et al., 2004);

Allo scopo di selezionare cloni eventualmente resistenti all'infezione da virus cardiotropici, da poter poi espandere e perfondere al bisogno, sono state acquisite colture di cellule staminali cardiache residenti murine (*Mus musculus* strain C57BL), ingegnerizzate con la sub unità catalitica della telomerasi (c-tert) (Laboratorio di Cardiologia Molecolare e Cellulare, università di Roma Tor Vergata), con ceppi vaccinali di Enterovirus umani, in particolare Cocksackie virus (ceppi B1-B6). Lo studio della suscettibilità all'infezione ai coxsackie virus di



queste colture cellulari, ha permesso di allestire un modello di infarto sperimentale murino. Tale modello sperimentale potrebbe essere applicato per studiare l'infettività di altri virus e per evidenziare le modificazioni cellulari e genomiche che avvengono in seguito all'infezione; scoprire nuovi marcatori dell'infezione e dell'eventuale morte cellulare.

## **3.Materiali e Metodi**

### **3.1 Colture cellulari**

Le colture cellulari eucariotiche sono dei sistemi semplificati che permettono il mantenimento e l' espansione di cellule in vitro (ex-vivo). Offrono inoltre il grandissimo vantaggio di poter ridurre la sperimentazione in vivo sugli animali, fornendo adeguati modelli per la ricerca in numerosi campi. Le colture cellulari rappresentano attualmente il più importante mezzo a disposizione per l'isolamento, la propagazione e l'identificazione dei virus animali (Poli G 1991).

Con il termine generico di “colture di tessuto” si intendono cellule, tessuti od organi, provenienti da animali e mantenuti e fatti sviluppare in vitro per oltre 24 ore. Più precisamente le colture di tessuto o d'organo si riferiscono ad espianti di tessuto od a frammenti d'organo le cui cellule sono rimaste ed hanno perciò conservato l'architettura originaria. Le colture di cellule, invece, sono ottenute da sospensioni cellulari allestite disgregando meccanicamente e chimicamente i tessuti: tali cellule, dopo la crescita, non presentano tracce della primitiva organizzazione e morfologia, assumendo un aspetto epitelioido o fibroblastico.

Le cellule che compongono i tessuti od organi animali (epidermide, reni, testicoli, tiroide), oppure interi embrioni (pulcino, topo, uomo) vengono separate una dall'altra mediante l'azione di enzimi proteolitici (tripsina); le cellule così ottenute sono fatte crescere a 37 °C con terreni speciali di coltura, in adatti recipienti di vetro o plastica (Figura. n 14).



**Fig. n. 14** Contenitori per colture cellulari-*fiasche pbi.net*

Questi terreni, costituiti da soluzioni saline bilanciate e opportunamente tamponate con sodio bicarbonato, contengono tutte le sostanze nutritive di cui le cellule hanno bisogno: sali, idrati di carbonio, vitamine, aminoacidi, più supplementi indispensabili per la crescita cellulare (siero fetale bovino, al 5-10% per la crescita, all'1-3% per il mantenimento); inoltre possono essere aggiunti di antibiotici ed antimicotici (penicillina, streptomina, gentamicina, amphotericina B) per prevenire le contaminazioni batteriche e fungine che porterebbero a morte cellulare. L'aggiunta di rosso fenolo consente di monitorare il terreno, che da un rosso-violaceo acceso vira al giallo per acidificazione ed esaurimento dei nutrienti da parte delle cellule. Le cellule così coltivate crescono aderendo al fondo del recipiente dove formano un tappeto confluento monostratificato, in cui vengono a contatto l'una con l'altra. A questo punto, in cui non c'è più spazio libero da invadere, le cellule normali cessano di dividersi. Questo fenomeno è noto come "inibizione da contatto" della divisione cellulare. Le cellule possono anche moltiplicarsi in sospensione, cioè in recipienti in cui il terreno colturale viene mantenuto in continuo movimento (colture in sospensione).

Le colture cellulari si distinguono in: colture primarie, se le cellule provengono da tessuti od organi prelevati direttamente dall'animale; vengono considerate come tali finché non vengono sub coltivate una prima volta, dando origine a colture secondarie. Le sub-colture di cellule primarie sono conosciute come colture di cellule diploidi, finché almeno il 75% delle cellule conserva le stesse

caratteristiche o cariotipo di quelle presenti nel tessuto od organo originario. Le cellule diploidi possono essere mantenute in vitro per lunghi periodi, ma generalmente dopo 40-60 passaggi seriali degenerano, a meno che non sopravvivano mutazioni nel genoma, che danno luogo a cellule poliploidi o trasformate. Queste cellule trasformate ed, in genere, quelle ottenute dai tessuti neoplastici, divengono spesso capaci di riprodursi indefinitamente in vitro, dando origine alle cosiddette linee cellulari continue o stabilizzate, con caratteristiche altamente indifferenziate. Le linee cellulari continue, di origine sia epiteliale sia fibroblastica, possono essere mantenute indefinitamente in laboratorio mediante sub-culture ad intervalli regolari, oppure congelate a  $-70^{\circ}\text{C}$  (ghiaccio secco o congelatore) o a  $-196^{\circ}\text{C}$  (azoto liquido), previa sospensione in terreno di coltura contenente dimetilsolfossido o glicerina (per stabilizzare la membrana cellulare). Le linee cellulari più comunemente usate per lo studio dei virus umani ed animali sono contrassegnate con le sigle HeLa (carcinoma della cervice umana), KB (carcinoma epidermoide della bocca umana), ecc..

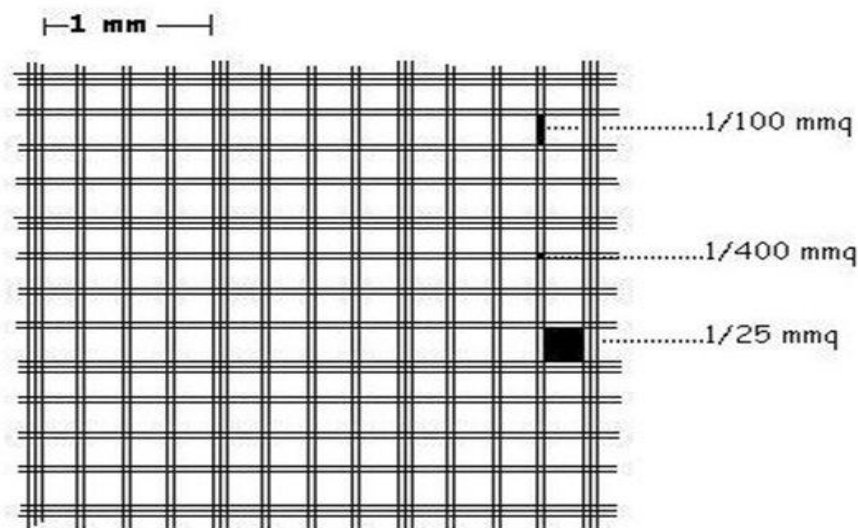
La semina delle cellule è di consueto preceduta da una conta cellulare, effettuata attraverso l'utilizzo della camera di Burker (Mariottini GI, Introduzione alle colture cellulari, 2003). Questo strumento consiste in una spessa lastrina di vetro rettangolare con un rilievo centrale, delimitato da ambo i lati da due scanalature parallele. Un solco trasversale divide il rilievo in due metà, ciascuna delle quali porta inciso un reticolo di conta (Figura n. 15).



**Fig. n. 15** Camera di Burker; *selfpediatrico.it*

I due reticoli vengono coperti da un unico vetrino coprioggetto tenuto aderente da due morsetti laterali metallici. Questa adesione lascia tra la camera ed il coprioggetto uno spazio di  $1/10$  mm, che può contenere un volume di  $1/10$  di  $\text{mm}^3$ . Ciascuna rete di conteggio è suddivisa in 9 quadrati delimitati da tre righe parallele per ciascun lato (Figura n. 16).

Ogni quadrato ha un'area di  $1\text{mm}^2$  ed un volume di  $0,1\text{ mm}^3$ ; i quadratini medi che si delineano internamente hanno un'area di  $1/25\text{ mm}^2$  ed un volume di  $1/250\text{ mm}^3$ ; i quadratini piccoli hanno un'area di  $1/400\text{ mm}^2$  ed un volume di  $1/4000\text{ mm}^3$ . La camera di Burkner viene riempita per capillarità subito dopo aver effettuato una diluizione 1:10 della sospensione cellulare appena tripsinizzata con il colorante vitale tripan blu (es:  $50\mu\text{l}$  di sospensione cellulare e  $450\mu\text{l}$  di colorante). Il colorante permette di distinguere tra cellule vive e morte: quelle vive non si colorano in quanto la struttura della membrana cellulare è intatta, mentre quelle morte risultano colorate di blu, in seguito alla penetrazione del colorante.



**Figura n 16 :** reticolo della camera di Burkner; *selfpediatrico.it*

Vengono contate solo le cellule che risultano vive all'osservazione al microscopio. Si contano le cellule in quattro quadrati e si effettua la media, in

modo da ridurre il margine di errore. Dato che un quadrato ha un volume pari a  $0,1 \text{ mm}^3$ , corrispondente a 0,1 unità, bisogna moltiplicare il numero medio di cellule osservate per un fattore pari a 10 per ricondurci all'unità e successivamente moltiplicare per 1.000, in maniera tale da avere il numero di cellule per ml. Le cellule crescono in adesione e vengono seminate in contenitori di vetro o plastica sterili (flasks) per una concentrazione finale di 2.500.000 cellule in una singola flask, addizionate ad adeguati mezzi di coltura liquidi o "terreni" (Figura n.17). Le cellule così trattate vengono conservate in particolari incubatori, che mantengono condizioni ottimali di temperatura ( $37^\circ\text{C}$ ) pressione parziale dell' $\text{O}_2$  (95%), della  $\text{CO}_2$  (5%) e un'umidità relativa che permette al terreno di non evaporare.



**Fig n. 17** Terreni per colture cellulari nei flaks e nelle capsulae petri-*shutterstock-cells in culture*

Per far continuare la crescita, si utilizza un procedimento detto tripsinizzazione, col quale si staccano le cellule dal substrato cui sono adese, si pellettizzano centrifugandole per 8 minuti ad una velocità di 14.000 rivoluzioni per minuto (rpm), si risospendono in una piccola aliquota di terreno per essere nuovamente inoculate negli appositi contenitori, per dare vita a colture secondarie (subculture) o "passaggi" (Mariottini GI, Introduzione alla colture cellulari, 2003). (Figura n. 18).

# Culture cellulari

- La maggior parte delle cellule in coltura replica ogni 24-48 ore e deve essere sub-coltivata ogni 3-4 giorni.

- Le cellule in sospensione sono diluite in nuovo terreno di coltura

- Le cellule in monostrato devono essere rimosse dalle superfici di crescita con enzimi proteolitici (tripsina) e sostanze chelanti (EDTA).

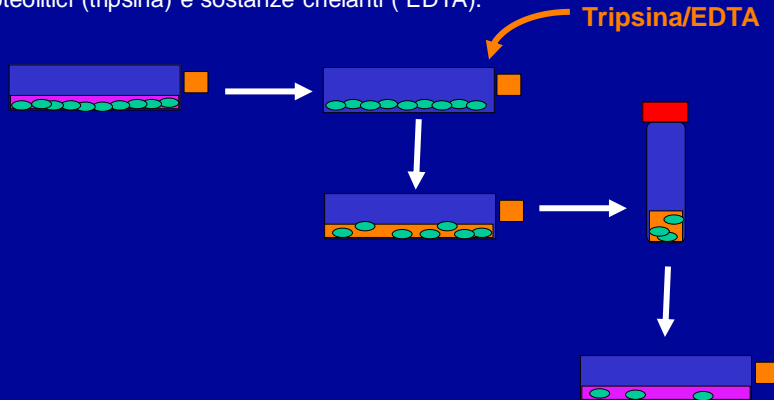


Fig. n. 18 Lezione “culture cellulari animali” Gary Whittaker

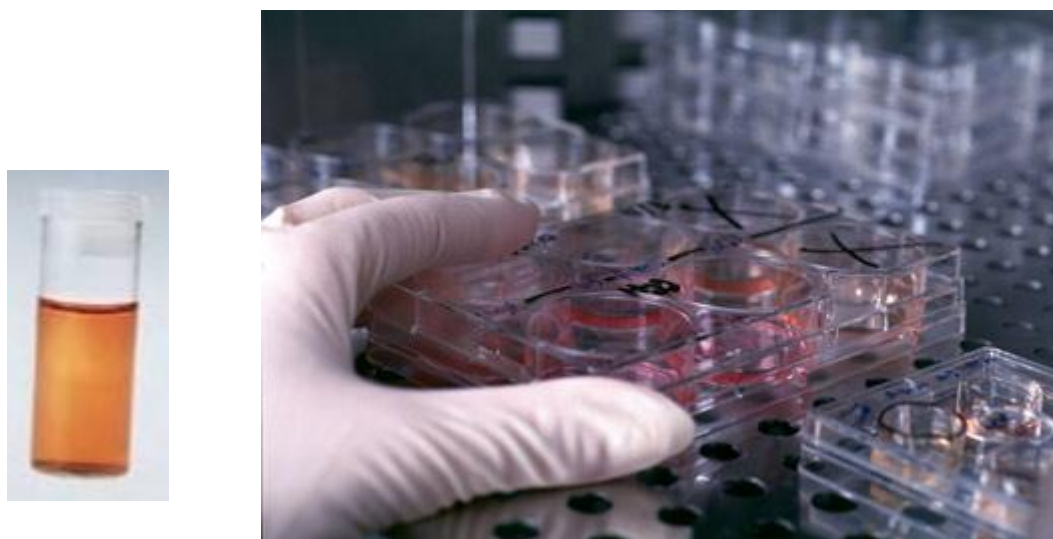
Le colture cellulari sono estremamente sensibili, e per maneggiarle occorrono specifiche competenze e strumentazione in grado di garantirne la sterilità. Tutte le operazioni di manipolazione vengono effettuate con strumentazione monouso e sterile sotto apposite cappe a flusso laminare verticale.

Per la realizzazione degli esperimenti sono state utilizzate due tipi di colture cellulari:

- **cellule staminali** adulte residenti cardiache murine (Mus musculus strain C57BL), ingegnerizzate con la subunità catalitica della telomerasi murina (C-TERT), coltivate con terreno fotosensibile brevettato (Di Nardo P, laboratorio di Cardiologia Molecolare e Cellulare, Università di Roma Tor Vergata) addizionato di siero fetale bovino ad una concentrazione pari al 10% del volume del terreno

utilizzato, concentrazione pari al 2% del volume del terreno durante l'ultima fase dell'allestimento delle "shell-vials" o delle micro piastre (Figura n. 19) per l'infezione con Cocksackievirus ceppi B1-B6. Una concentrazione minore di siero favorisce infatti il processo infettivo.

- **cellule della linea di controllo KB**, che sono suscettibili all'infezione con Enterovirus (Human Epidermoid Carcinoma, Istituto Zooprofilattico Bruno Ubertini), coltivate in terreno minimo DMEM, addizionato con il 10% di siero fetale bovino per l'espansione delle cellule e con il 2% di siero per l'allestimento delle "shell-vials" o delle micropiastre da infettare con i Cocksackievirus B1-B6.



**Fig. n. 19** Shell-vials e micropiastre shutterstock-cells in culture



### 3.2 Estrazione RNA

Per verificare l'espressione del recettore CAR, responsabile della suscettibilità all'infezione con Enterovirus della linea staminale cardiaca murina c-tert, è stato estratto l'RNA (RNeasy Mini Kit Handbook, QIAGEN) dalla linea staminale cardiaca murina c-tert, isolata nel laboratorio di Cardiologia Molecolare e Cellulare, Università di Roma Tor Vergata, e dalla linea cellulare di controllo KB (Human Epidermoid Carcinoma, Istituto Zooprofilattico Bruno Ubertini).

La qualità e la quantità dell'RNA estratto e' stata analizzata mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio (Figura n. 20) e analisi spettrofotometrica.

Lo spettrofotometro, che permette la rilevazione della concentrazione dell'RNA nei campioni, esegue delle "letture" a tre diverse lunghezze d'onda, ovvero a 230 nm (valore a cui carboidrati, proteine ed etanolo assorbono la luce); a 260 nm (valore di assorbimento delle basi dell'RNA); a 280 nm (valore caratteristico di assorbimento delle basi del DNA). I valori ottenuti vengono elaborati da uno specifico programma computerizzato che estrapola: 1) l'indice di purezza dell'RNA dai carboidrati e dai residui chimici, espresso come rapporto tra l'assorbanza a 260 nm e a 230 nm; 2) l'indice che rispecchia l'integrità dell'RNA e il grado di contaminazione da DNA genomico, espresso come rapporto tra l'assorbanza a 260 nm e a 280 nm. Per essere significativi, tali indici devono risultare approssimativamente uguali a 2. Il principio dell'elettroforesi si basa sul fatto che campioni di DNA o RNA, caricati in pozzetti ottenuti con un apposito "pettine" nel gel di agarosio disciolto in tampone TAE, sottoposti ad un campo elettrico migrano in posizioni precise, determinate dall'orientamento del campo, dai tempi della corsa e soprattutto dalla grandezza delle molecole: si ha così la "separazione" netta di bande, che possono essere confrontate con marcatori di peso molecolare o di dimensione (markers o ladders) per avere conferma della loro specificità e corrispondenza ai segmenti genici attesi. Le bande, visualizzate grazie ad un'apposita apparecchiatura a raggi UV, devono la loro luminescenza

all'aggiunta del Bromuro di Etidio al gel, un agente intercalante delle basi del DNA sensibile agli UV.



**Fig. n. 20** Elettroforesi su gel di agarosio all'1% in TAE buffer 1X di 10 $\mu$ L di RNA estratto e 2  $\mu$ L di blu di bromofenolo.

### **3.3 Retrotrascrizione in cDNA (RT-PCR)**

Su l'RNA estratto dalla linea staminale cardiaca murina c-tert e dalla linea cellulare di controllo KB, e' stata eseguita una retro trascrizione a DNA complementare ( RT-PCR) con il primer reverse specifico (TIB MOLBIOL). Il DNA complementare è stato successivamente amplificato mediante amplificazione polimerasica a catena (PCR).

La reazione polimerasica a catena, ideata nel 1983 da Kary B. Mullis (Mullis 1990), è una tecnica di biologia molecolare che permette di replicare in vitro una regione di DNA a doppio filamento utilizzando gli elementi di base del naturale processo di replicazione. In particolare, la RT-PCR è una metodica che consente di effettuare reazioni di retrotrascrizione, ovvero sintetizzare DNA complementare (cDNA) partendo da una stampo di RNA a singolo filamento che, una volta prodotto, viene amplificato per ottenere un gran numero di copie dello stesso.

L'intero processo si articola in due fasi:

- **Prima fase:** PRE-RT in cui avviene l'annealing del primer antisenso all'RNA. La miscela di reazione è pertanto formata solo da questi due componenti l' RNA estratto (10µl) e primer antisenso (3µl) che vengono incubati per 10 minuti a 65°C.
- **Seconda fase:** Reazione di retrotrascrizione. Vengono quindi aggiunti nella provetta i componenti della MIX, mantenendo tutti i componenti della reazione a 0°C per essere reincubati alle temperature di 55°C per 30 minuti e di 85°C per 5 minuti.

La **MIX** è composta dal Transcriptor RT Reaction Buffer 5x (4µl), Protector RNase Inhibitor\* (0,5µl), dNTPs (2µl), l'enzima Transcriptor Reverse Transcriptase (0,5µl) (Roche).

Il profilo di amplificazione utilizzato è il seguente:

65°	10min
55°	30min
85°	5 min
4	∞

### 3.4 PCR con primer specifici

L'espressione del recettore CAR sia nella linea cellulare c-tert che nella linea cellulare di controllo KB e' stata rivelata attraverso una PCR con primer specifici (TIB MOLBIOL) (Sollerbrant K et al., 2007).

La Reazione a catena della Polimerasi, elaborata e brevettata nel 1985 da Kary B. Mullis, è una metodica che ha rivoluzionato la ricerca biologica e trova ad oggi innumerevoli applicazioni in diversi campi. L'impiego di una DNA Polimerasi

termostabile (**Taq** Polimerasi, isolata dal batterio *Thermophilus Aquaticus*) ne garantisce una resa ottimale, poiché questo enzima è in grado di sopportare, senza andare incontro a denaturazione, le diverse temperature utili al processo, ottenute mediante l'apposito termociclatore programmabile (Figura n. 21 ). La polimerasi è in grado di sintetizzare filamenti complementari allo stampo grazie alla presenza di particolari sequenze dette primer o inneschi: si ha così l'amplificazione esponenziale di sequenze geniche prescelte. Il processo della PCR in dettaglio prevede diverse fasi (Dale WJ et al, Dai geni ai genomi, 2009):

#### **I° Step, denaturazione del DNA:**

la separazione del double strand del DNA avviene in un lasso di tempo di circa in 30'' alla temperatura di 94°C, alla quale i legami idrogeno tra le basi non sono più stabili.

#### **II° Step, annealing:**

l'appaiamento dei primers consiste in una ibridazione DNA-DNA; questa dura 1' e la temperatura ottimale, scelta solitamente in un intervallo compreso tra i 40° e i 60°C, va calcolata a seconda di diversi parametri: la lunghezza in basi dei primer, il contenuto in purine e pirimidine ( e quindi la forza dei legami ), la specificità dell'appaiamento che vogliamo ottenere.

#### **III° Step, extension:**

innalzando la temperatura a 72°C, la Taq comincia a sintetizzare un nuovo filamento complementare allo stampo, con una processività di circa mille basi al minuto. I double strands prodotti nel primo ciclo saranno costituiti da un filamento stampo originale e da uno neosintetizzato, che terminerà in maniera aspecifica, in base al punto in cui si è fermata la Polimerasi nel momento d'interruzione del processo. Nei cicli successivi prevarranno i frammenti corti neosintetizzati, delimitati specificamente ad entrambe le estremità dalle sequenze dei primer.

**Fig. n. 21** Termociclatore-*directindustry.it*



I primer utilizzati per l'amplificazione sono:

<b>Forward</b>	<b>5'-CGATGTCAAGTCTGGCGA-3'</b>
<b>Reverse</b>	<b>5'-GAACCGTGCAGCTGTATG-3'</b>

Il profilo di amplificazione utilizzato è il seguente:

94°	1min	}	5 cicli
52°	1min		
72°	1,30min		
94°	45sec	}	30 cicli
52°	30sec		
72°	1min		
72°	15min		
4	∞		

**La miscela di reazione della PCR è costituita da:** Buffer 10x , MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, Primer Forward, Primer Reverse, cDNA (10µl), Taq, H<sub>2</sub>O per un volume finale di 50 µl.

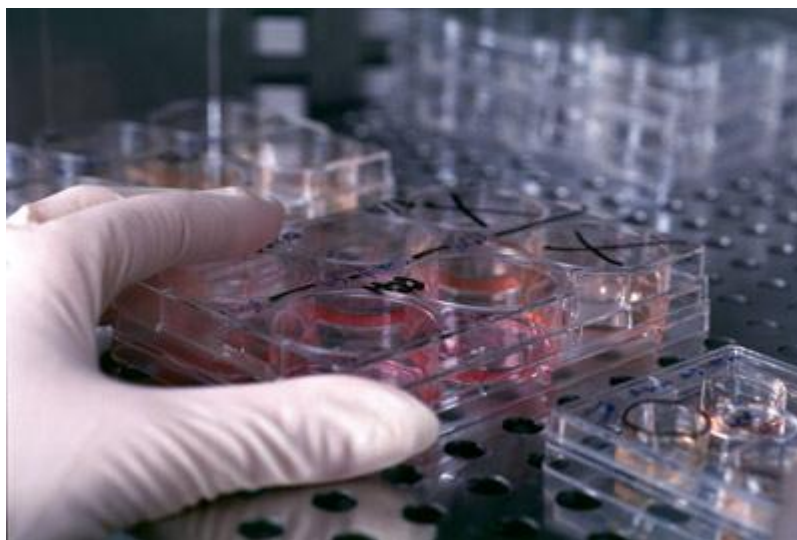
### **3.5 Saggio Immunoenzimatico.**

Per verificare l'espressione della proteina **CAR** sulla membrana delle cellule C-TERT è stato effettuato un saggio immunoenzimatico. Le cellule sono state fissate nei pozzetti di una micropiastre (Biotrin) o in alternativa su vetrino per IFA mediante trattamento con una soluzione tampone di etanolo e di acetone 1:1 a -20°C per un intervallo minimo di 15'. Eliminata la soluzione tampone, le cellule sono state coperte con un anticorpo monoclonale in grado di riconoscere il recettore CAR (SIGMA ALDRICH) – prodotto nel coniglio (rabbit) – diluito 1:500. Dopo 30' di incubazione a 37°C e al 5% di CO<sub>2</sub> per permettere l'eventuale formazione del complesso antigene-anticorpo primario, la soluzione contenente l'anticorpo libero è stata rimossa, e sono stati effettuati dei lavaggi in PBS per eliminare gli anticorpi legati specificamente. Per rilevare il complesso antigene-anticorpo primario è stato utilizzato un anticorpo secondario – anti-rabbit - coniugato con l'enzima perossidasi (SIGMA ALDRICH), incubato alle stesse condizioni dell'anticorpo primario. Aggiunto il substrato della perossidasi (Biotrin) e la soluzione bloccante dopo 30' di incubazione, la rilevazione della reazione enzimatica è stata eseguita mediante analisi con lettore di microspiastrine (Biotrin) e con lettura colorimetrica. Al fine di validare il test, come controllo positivo sono state utilizzate le cellule della linea KB.

### **3.6 Infezione delle linee cellulari, estrazione e rilevazione dell'RNA virale**

Le cellule della linea cellulare c-tert, dopo essere state staccate chimicamente dal flak originario, lavate e ripellettizzate in terreno (D-MEM), contate in camera di Burker, distribuite in opportune micropiastre (Figura n. 22) tali da avere circa 200.000 cellule/ml in ogni pozzetto, sono state infettate con 200µl di una miscela di ceppi vaccinali di riferimento di virus Cocksackie B1-B6, utilizzando

concentrazioni di 100 dosi citopatiche al 50% in 75µl e 5 diluizioni seriali in base 10. Come controllo positivo è stata utilizzata la linea cellulare KB, permissiva e competente per i virus Cocksackie.



**Fig. n. 22** micropiastre Infezione-*shutterstock-cell in culture*

Le cellule infettate sono state incubate per 2 ore a 37°C e al 5% di CO<sub>2</sub>, per permettere la fase di adsorbimento. Al termine del periodo di incubazione la miscela contenente il virus e' stata eliminata e le colture lavate con tampone salino sterile o con terreno D-MEM e incubate con terreno specifico brevettato al 2% di siero fetale bovino (Euroclone). Le colture cellulari infettate sono poi state osservate al microscopio ottico ad intervalli regolari di tempo, ovvero dopo 48, 72 e 96 ore dall'infezione, per verificare l' eventuale effetto citopatico.

Ad ogni tempo dall'infezione e' stato recuperato e ultrafiltrato il surnatante ed analizzato per la ricerca del genoma virale mediante RT e NESTED PCR utilizzando primers specifici, *All-Enterovirus* (TIB MOLBIOL) (Simmonds et al., 2009).

La stessa procedura e' stata eseguita per infettare la linea cellulare c-tert con ciascun ceppo di virus Cocksackie separatamente, al fine di escludere la possibilità di fenomeni di interferenza virale o di maggiore suscettibilità ad uno dei ceppi utilizzati.

L'RNA e' stato estratto dalle linee cellulari infettante (RNeasy Mini Kit Handbook, QIAGEN) e l'RNA virale estratto dai surnatanti (QIAmp Viral Mini Handbook Kit QIAGEN) recuperati ad ogni tempo dell'infezione. E' stata poi analizzata la concentrazione dell'RNA mediante analisi spettrofotometrica e/o corsa elettroforetica.

Poiché i virus Cocksackie presentano un acido nucleico ad RNA, la ricerca del genoma virale sia nelle cellule infettate che nel surnatante e' stata eseguita mediante RT-PCR, seguita da una nested PCR, che consiste nel realizzare due PCR successive utilizzando coppie di primer differenti, con la seconda coppia che sottende una sequenza inclusa in quella amplificata dalla prima coppia.

I primer del primo step di amplificazione sono:

<b>Forward</b>	<b>5'-TTAAAACAGCCTGTGGGTTG-3'</b>
<b>Reverse</b>	<b>5'-ATTGTCACCATAAGCAGCCA- 3'</b>

I primer del secondo step di amplificazione sono:

<b>Forward</b>	<b>5'-GGNAYY YTWGTRCGCCTGTTTT-3'</b>
<b>Reverse</b>	<b>5'-CACCCAAAGTAGTCGGTTCCGC-3'</b>

Il profilo di amplificazione utilizzato e' il seguente:

I STEP		
94°	1min	} 5 cicli
55°	1min	
72°	1,30 min	
94°	45sec	} 30 cicli
55°	30sec	
72°	1min	
72°	15min	
4°	∞	



**La miscela di reazione della PCR (I STEP) è costituita da:** Buffer 10x , MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, Primer Forward, Primer Reverse, **cDNA (10µl)**, Taq, H<sub>2</sub>O per un volume finale di 50 µl.

II STEP		
94°	1min	} 5 cicli
60°	1min	
72°	1,30min	
94	45sec	} 30 cicli
55°	30sec	
72°	1min	
72°	15min	
4°	∞	

**La miscela di reazione della PCR (II STEP) è costituita da:** Buffer 10x , MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, Primer Forward, Primer Reverse, **cDNA (5µl)**, Taq, H<sub>2</sub>O per un volume finale di 50 µl.

### 3.7 Immunofluorescenza indiretta

E' possibile rendere visibile una reazione antigene-anticorpo, marcando uno dei reagenti con sostanze, chiamate fluorocromi (fluoresceina, rodamina), che hanno la capacità di emettere fluorescenza (rispettivamente verde e rossa), se osservate con un microscopio a luce ultravioletta (UV).

La tecnica è applicabile a sezioni di tessuto, colture cellulari o strisci di sospensioni di cellule animali, batteriche e protozoarie. Due sono i metodi principali utilizzati per l'immunofluorescenza.

Nel metodo diretto sono coinvolti solo l'antigene e l'anticorpo coniugato con il fluorocromo. Nel metodo indiretto l' anticorpo coniugato con il fluorocromo non

si lega direttamente all'antigene ma ad un complesso antigene-anticorpo primario come un "sandwich".

Per la ricerca dell'espressione degli antigeni virali e' stato utilizzato il kit Pan Entero, Blend Light Diagnostic. Le cellule fissate mediante trattamento con una soluzione di etanolo ed acetone 1:1 per un almeno 15 minuti sono state trattate con una miscela di anticorpi monoclonali murini che riconoscono gli antigeni di tutti gli enterovirus. L'anticorpo secondario, coniugato con fluorocromi, riconosce in maniera specifica e lega l'anticorpo primario murino.

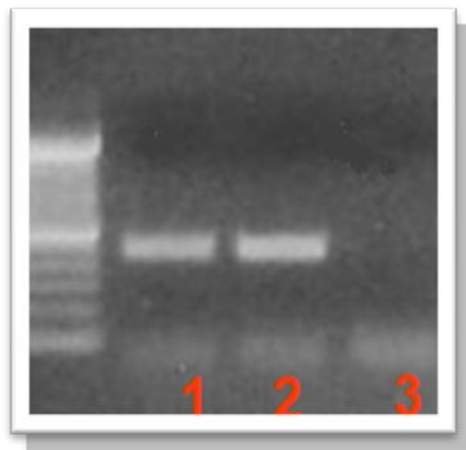
Le colture cellulari ad ogni tempo dall'infezione sono state lavate in tampone PBS per eliminare eventuali residui di siero e fissate su vetrini mediante trattamento con una miscela di etanolo:acetone 1:1. Le cellule sono poi state incubate con l'anticorpo primario per 30 minuti a 37°C in atmosfera al 5% di CO<sub>2</sub>; al termine dell'incubazione le cellule lavate, asciugate, sono state trattate con l'anticorpo secondario fluoresceinato. I vetrini sono poi stati osservati al microscopio a fluorescenza.

L'IFA è stata eseguita in tandem alle indagini biomolecolari, ogni qual volta è stato approntato un ciclo d'infezione.

## 4. Risultati

### 4.1 Espressione del Recettore CAR

La ricerca dell'RNA del recettore CAR ha rivelato che tale recettore risulta espresso sia nella linea cellulare di controllo KB che nella linea staminale c-tert (Figura n. 23).



**Figura n. 23** Elettroforesi su gel di agarosio al 2% in TAE buffer 1X di 10 $\mu$ L del prodotto di PCR per la ricerca CAR e 2  $\mu$ L di blu di bromo fenolo; 1KB Recettore CAR; 2 C-tert Recettore CAR (400 bp); 3H<sub>2</sub>O. (marker di peso molecolare di 100 bp, Invitrogen)

Il saggio immunoenzimatico ha rivelato la presenza della proteina CAR sulla membrana citoplasmatica sia delle cellule C-TERT sia delle cellule di controllo KB (Fig. n. 24 )



**Figura n. 24** Saggio immunoenzimatico per l'espressione del recettore CAR

## **4.2 Infezione delle cellule C-TERT e della linea di controllo KB:**

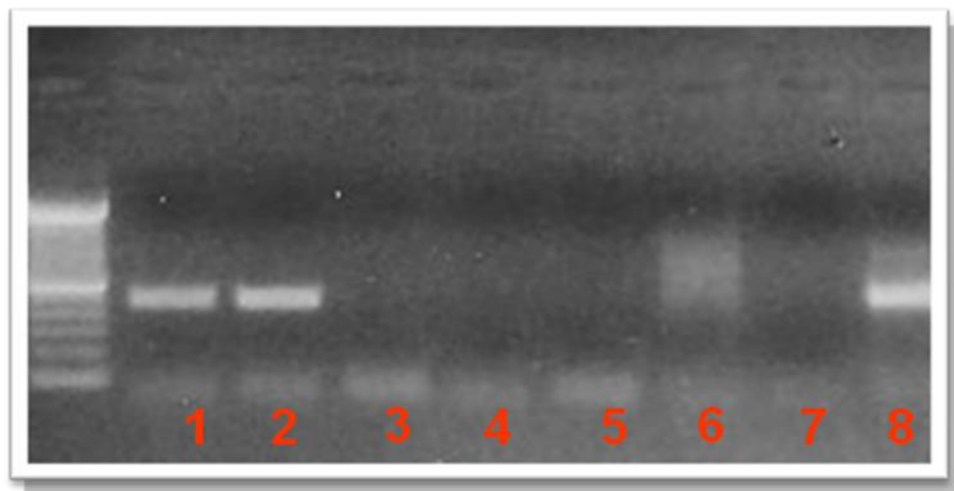
### **Effetto citopatico**

In seguito all'infezione delle linee cellulari con la miscela di virus Coxsackie (ceppi B1-B6) vaccinali e con ciascun ceppo impiegato singolarmente, si sono riscontrati per il controllo positivo KB evidenti segni di sofferenza e morte cellulare già dopo 48 ore dall'infezione fino alla terza diluizione impiegata. Tali effetti si manifestavano come perdita della forma, ingrossamento e inclusioni cellulari, formazione di sincizi e aspetti necrotici. La linea cellulare c-tert, al contrario, non ha manifestato alcun segno di effetto citopatico osservata a tutti i tempi dall'infezione ed a tutte le diluizioni eseguite.

### **NESTED PCR**

L'analisi molecolare ha mostrato che il genoma virale è presente all'interno della linea KB infettata con la miscela dei 6 ceppi e con ciascun ceppo singolarmente a tutti i tempi dall'infezione analizzati e fino alla terza diluizione (Figura n.25). Inoltre, il genoma virale è stato ritrovato anche nel surnatante delle colture della linea cellulare di controllo.

Per quanto riguarda, invece, la linea cellulare c-tert infettata l'RNA virale è stato ritrovato solo a livello cellulare e non nel surnatante. Questo risultato è valido per tutti i tempi dell'infezione presi in considerazione e sia per la miscela virale infettante che per ciascun ceppo virale impiegato singolarmente nell'infezione.

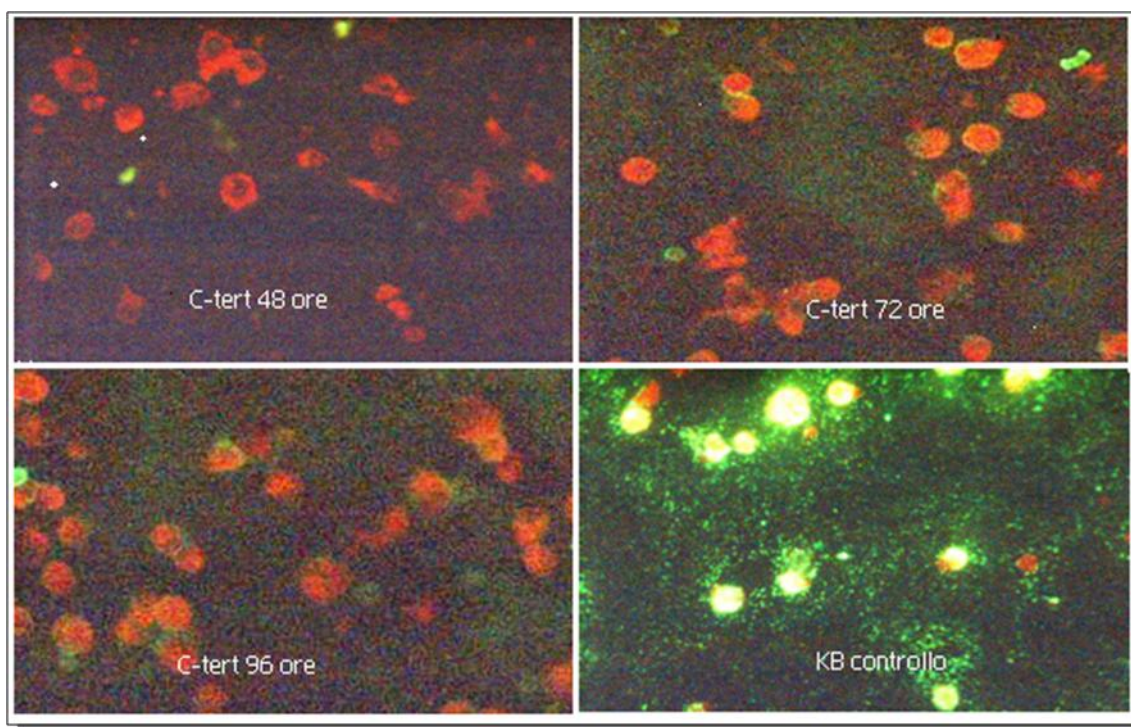


- 1 KB surnatante
- 2 KB cellule
- 3 K- RT surnatante
- 4 K- RT cellule
- 5 K- PCR surnatante
- 6 K- PCR cellule
- 7 C-tert surnatante
- 8 C-tert cellule

**Figura n. 25** Elettroforesi su gel di agarosio al 2% in TAE buffer 1X di 10 $\mu$ L del prodotto di PCR per la ricerca del genoma virale (300-400bp) e 2  $\mu$ L di blu di bromofenolo.  
(marker di peso molecolare di 100 bp, Invitrogen)

### 4.3 Espressione antigenica

L'analisi dell'espressione antigenica virale nelle due linee cellulari, eseguita dopo 48, 72 e 96 ore dall'infezione, ha rivelato che gli antigeni virali risultano espressi solo nella linea cellulare di controllo KB, infettata con la miscela dei sei ceppi vaccinali e con ciascun ceppo singolarmente, alle diluizioni 1/10, 1/100 e 1/1000. Non si riscontra pertanto espressione di antigeni virali nella linea cellulare c-tert a tutti i tempi dall'infezione considerati e a tutte le diluizioni utilizzate (Figura n. 26).



**Fig. n. 26** Immunofluorescenza indiretta con anticorpi primari pan-entero (Blend Light Diagnostic). Quadranti 1, 2, 3: cellule C-TERT a 48, 72, 96 ore post-infezione; quadrante 4: linea di controllo KB. È rilevata la presenza degli antigeni virali mediante anticorpo secondario coniugato a fluoresceina, solo nella linea di controllo KB.

## 5. Discussione

L'infarto del miocardio che è la principale causa di morbidità e mortalità nei paesi industrializzati, è causato nel 50% dei casi da cardiomiopatia dilatativa (CMD), spesso ad eziologia infettiva-infiammatoria a carico del tessuto miocardico (Ellis CR et al., 2007). Alcuni fattori di rischio, genetici e/o acquisiti, classificabili come fattori di rischio coronarico, sono predisponenti all'insorgenza dell'infarto nella maggior parte dei soggetti colpiti (Davidson C, 2008), ma nel 10% dei soggetti infartuati l'infarto è associato a miocardite di origine infettiva-virale e CMD (Baughman LK, MD, 2006; Cooper TL, MD, 2009). L'eziologia virale è confermata da molti studi che hanno rilevato la presenza di genomi virali nel tessuto cardiaco di pazienti affetti da CM (Martino TA et al., 1994; Kuhl U et al., 2005) ed, in particolare, è stato riscontrato che i virus maggiormente cardiotropici sono gli Adenovirus (tipo 2 e 5) e gli Enterovirus, in particolare Cocksackie virus (ceppi B1-B6) (Nigro G et al., 2000; Takano H et al., 2008). Meno frequentemente: Citomegalovirus (CMV), Epstein Barr virus (EBV), virus erpetico umano 6 (HHV6), parvovirus B19 (PVB19) (Nigro G et al., 2000, virus dell'epatite C (Prati D et al., 1999). Sono inoltre stati descritti casi di miocardite virale fulminante da Herpes simplex 1 (HSV-1) ed EBV (Koga et al. 2001, Takaki I. et al., 2005).

Il meccanismo patogenetico d'infezione del miocardio da Adenovirus ed Enterovirus non è ancora stato del tutto chiarito. Molti studi riportano che il recettore "*Cocksackie and Adenovirus Receptor*" (CAR) e il co-recettore "*Decay-Accelerating Factor*" (DAF), due proteine di superficie espresse tra le altre sulle cellule del miocardio, permetterebbero il riconoscimento virus-cellula e l'adsorbimento agendo sinergicamente (Bergelson JM et al., 1997; Tomko RP et al., 1997). L'adsorbimento e l'internalizzazione sono inoltre favoriti da un corecettore, il "*Decay accelerating factor*" o "*DAF*", che sembra formare un complesso con il recettore CAR (Yajima T, Knowlton KU, 2009). Il recettore DAF sembra aumentare l'efficienza dell'internalizzazione in particolar modo dei Cocksackievirus e la loro diffusione mediante il processo di transitosi,



determinando così un'amplificazione dell'infezione virale, la cui dinamica prevede che le particelle virali vengano internalizzate in vescicole di caveolina che possono transitare nella cellula mediante scorrimento ATP-dipendente sui microfilamenti actinici del citoscheletro e riversare il loro contenuto sul versante opposto a quello d'ingresso, permettendo la diffusione dei virus anche negli strati più profondi del tessuto (Selinka HC et al, 2004). Grazie a questo processo di diffusione l'effetto citopatico da Coxsackievirus potrebbe interessare non soltanto i cardiomiociti adulti, ma anche le cellule staminali cardiache residenti, una cui compromissione fornirebbe una valida spiegazione della mancanza di "self-renewal" delle cellule cardiache per sopperire alla necrosi tissutale.

La variabilità genetica dell'ospite influenza l'andamento delle malattie infettive e di conseguenza la variabilità della risposta immunitaria. Per l'infezione da coxsackie virus e adenovirus può essere in parte legata all'espressione transitoria del recettore CAR. Numerosi polimorfismi genici riferiti ad individui e popolazioni conferiscono resistenza o modulano la suscettibilità alle infezioni virali (Abdel-Azim GA et al., 2005). Ne sono esempio:

- La resistenza ad HIV conferita da una delezione di 32 paia di basi nell'open reading frame del gene che codifica il recettore CCR5 (De Souza PR et al., 2005; Picton AC, 2010).
- la suscettibilità ad HCV conferita da geni che regolano la crescita cellulare (Ciclina CDC20, CDK4, Myb) e geni che controllano diverse cascate di trasduzione del segnale ( $\beta$ -catenina, metallo proteinasi) (Bassiouny AE et al., 2010).
- la risposta immune all'infezione da HBV modulata da numerosi SNPs nelle regioni codificanti HLA-DPA1 and HLA-DPB1 (Kamatani Y et al., 2009).
- La suscettibilità all'infezione da CMV determinata dal gene CMV1 (Depatie C et al., 1997).

Le basi molecolari del tropismo cardiaco e del meccanismo patogenetico delle miocarditi causate da CMV, EBV, HHV6, PVB19 e HCV sono ancora ignote.

Nonostante i continui progressi raggiunti negli ultimi anni nella conoscenza dei meccanismi molecolari e cellulari della fisiopatologia cardiaca, ad oggi, mancano trattamenti farmacologici risolutivi in grado di preservare le cellule cardiache contrattili danneggiate durante l'infarto. Pertanto l'unico trattamento possibile per curare questa patologia è rappresentato dal trapianto d'organo o impianto di cellule staminali (Forte G et al., 2009).

La terapia cellulare con impianto di cellule staminali adulte, con capacità di generare nuovi cardiomiociti, potrebbe quindi rappresentare un approccio risolutivo per rimpiazzare i cardiomiociti danneggiati irreversibilmente in seguito all'infarto (Forte G et al., 2009).

In vista della possibilità di attuare una terapia sostitutiva nei soggetti colpiti da infarto causato da miocardite di origine infettivo-virale, e focalizzando l'attenzione sulla capacità dei virus di persistere in molti tessuti ed essere possibilmente riattivati dalla soppressione del sistema immunitario (Kühl U, 2005), un adeguato approccio al problema potrebbe essere supportato unicamente dall'impianto di cellule staminali adulte resistenti all'infezione virale. Per ottimizzare un protocollo *in vitro*, che generi ed espanda cellule staminali cardiache da impiantare in caso di infarto, le cellule impiegate dovrebbero essere adeguatamente selezionate tra le varie possibili fonti di cellule staminali e successivamente analizzate per valutarne la suscettibilità alle infezioni da virus cardiotropici.

Sono state recentemente propagate in coltura linee cellulari staminali ottenute da vari organi, tra i quali midollo osseo, fegato e cuore, per verificare la possibilità di generare *in vitro*, da differenti tessuti umani adulti, cellule staminali multipotenti che potrebbero essere indotte a differenziarsi in maniera indipendente dal tessuto di provenienza ed essere efficacemente impiegate per riparare i tessuti danneggiati (Beltrami AP et al., 2007). Particolare interesse destano le cellule staminali mesenchimali del midollo osseo, dotate di grande plasticità e che hanno sino ad

ora trovato numerose applicazioni in diversi campi (Kuo TK et al, 2008; Banas A et al, 2008). Le MSC vengono coltivate e mantenute indifferenziate con terreni di coltura minimi, addizionati di siero fetale bovino e degli amminoacidi e degli zuccheri essenziali per il metabolismo cellulare, ma privi di specifici fattori di crescita. Per ottenerne il "commitment" vengono addizionate diverse sostanze ai terreni di coltura (Franceschi RT, 1992; Wang Y et al., 2006). Le MSC vanno incontro a senescenza in relazione all'arresto del loro ciclo vitale. E' possibile ottenere delle linee cellulari staminali mesenchimali murine (mTERT-MS) mediante trasfezione delle MSC con la subunità catalitica della telomerasi murina (Forte G et al., 2009); analisi del cariotipo dimostrano che le cellule così ingegnerizzate non sviluppano anomalie cromosomiche e mantengono inalterate le capacità proliferative e differenziative (Zipori D, 2004). Sono state ottenute sulla base di questo principio delle cellule cardiache del ceppo murino *Mus musculus* strain C57BL mediante trasfezione della telomerasi murina ingegnerizzate con la subunità catalitica della telomerasi (C-TERT, Istituto di Cardiologia Molecolare e Cellulare, Roma Tor Vergata). Tali cellule non manifestano né senescenza né differenziamento.

E' stata analizzata la suscettibilità all'infezione della linea cellulare c-tert con ceppi B1-B6 di Coxsackie virus, miscela ed ogni singolo ceppo. Come controllo positivo è stata impiegata la linea cellulare KB (Human Epidermoid Carcinoma, Istituto Zooprofilattico Bruno Ubertini), suscettibile ad infezione da Enterovirus (Barnard DL et al., 2004).

L'indagine molecolare e immunologica sulle cellule staminali cardiache residenti murine (*Mus musculus* strain C57BL) ha rilevato che sia l'RNA che la proteina CAR risultano espresse, come anche nella linea cellulare di controllo KB, ad indicare che già a questo stadio di sviluppo le cellule dovrebbero permettere almeno l'internalizzazione virale.

Tale risultato concorda con quanto riportato in letteratura circa l'espressione del recettore CAR a livello delle cellule cardiache murine (Selinka HC et al., 2004).

Inoltre, sono in corso gli esperimenti per determinare l'espressione del co-recettore DAF in entrambe le linee cellulari. Tutti gli studi presenti in letteratura indicano che la presenza del co-retettore DAF aumenta solo l'efficienza di

internalizzazione, ma non e' necessario ne' sufficiente perché avvenga il processo infettivo (Selinka HC et al., 2004).

La presenza del recettore principale CAR e' sufficiente affinché avvenga il riconoscimento e l'internalizzazione delle particelle virali vaccinali di virus Coxsackie dato che il genoma virale e' stato ritrovato all'interno delle cellule infettate di entrambe le linee cellulari. La mancanza di espressione di antigeni virali e di positività al genoma virale nel surnatante delle colture c-tert infette indica invece una replicazione virale poco efficiente: le cellule sono permissive ma non produttive. Questo potrebbe essere riconducibile ad un macchinario biosintetico cellulare non idoneo alla replicazione virale, dato il basso grado di differenziazione, come riportato in letteratura per altre infezioni virali (Zhang M et al., 2010). Le cellule staminali c-tert sono risultate permissive sia per la miscela dei ceppi vaccinali che per i singoli ceppi alle stesse concentrazioni e pertanto ciò indica una uguale suscettibilità all'infezione per tutti i virus Coxsackie del ceppo B, potendo così escludere fenomeni di interferenza virale dei vari ceppi.

Tuttavia, l'esatto meccanismo coinvolto nella infezione di CVB dei cardiomiociti è sconosciuta. Sarebbe però fondamentale e necessaria la ricerca di altri biomarcatori per chiarire completamente i meccanismi che guidano il processo di infezione (Matteoli Barbara et al., 2011). Utilizzando sempre questo modello sperimentale murino si potrebbe continuare la strada per chiarire completamente il meccanismo patogenetico alla base della risposta all'infezione virale ed in particolare dell'infezione virale delle cellule miocardiche. Sulla base di questo modello si potrebbe risalire in futuro alla creazione dell'equivalente modello sperimentale umano, dopo aver chiarito però alcune varianti venute alla luce da studi recenti condotti sulle corrispettive linee cellulari umane (Scassa et al., 2010).

## 6. Conclusioni

Dall'analisi dei dati ottenuti nel presente lavoro di tesi è possibile concludere che:

- Le cellule staminali cardiache murine C-TERT esprimono il recettore CAR cosiccome la linea cellulare di controllo KB.
- le cellule staminali cardiache C-TERT sono permissive nei confronti dei ceppi vaccinali di Coxsackievirus B1-B6. La linea C-TERT risulta infatti positiva per il genoma virale a tutti i tempi esaminati e a tutte le diluizioni impiegate (1/1000) per l'infezione, ad indicare che le cellule permettono l'internalizzazione delle particelle virali come le linee cellulari di controllo KB.
- le cellule C-TERT sono permissive e non sono competenti alla replicazione virale, poiché il genoma non è stato ritrovato nel surnatante delle colture, che non hanno mostrato espressione di antigeni virali né segni di sofferenza e morte cellulare dopo l'infezione con i Coxsackievirus, diversamente dalla linea cellulare di controllo KB.
- Le C-TERT sembrano quindi non possedere un adeguato macchinario biosintetico necessario alla replicazione dei virus e alla produzione di progenie virale.

## 7. Prospettive future

Il presente lavoro di ricerca potrebbe gettare le basi per adattare in futuro questi esperimenti allo studio di patologie ad eziologia virale e non, proprio perché queste colture cellulari si sono rivelate un ottimo modello in vitro per studiare le reazioni, le risposte della cellula ad agenti esterni, che siano virus, batteri, protozoi o agenti di natura chimica e fisica. Si potrebbe prevedere di:

- stabilire la suscettibilità alle infezioni della linea cellulare staminale murina cardiaca c-tert con isolati clinici di virus Cocksackie provenienti da campioni di liquido pericardico di pazienti affetti da miocardite virale;
- stabilire la suscettibilità alle infezioni della linea cellulare staminale murina cardiaca c-tert con isolati clinici virali diversi da Cocksackie;
- valutare un possibile impiego della linea staminale c-tert per terapia miocardiocitica sostitutiva nel modello d'infarto sperimentale murino;
- comprendere meglio il meccanismo molecolare di interazione virus-cellula analizzando il pattern di espressione di geni coinvolti nel pathway infiammatorio ed apoptotico della linea staminale c-tert, in seguito ad infezione virale, mediante microarray dedicati.

## 8. Bibliografia

**Abdallah BM, Haack-Sørensen M, Burns JS, Elsnab B, Jakob F, Hokland P, Kassem M.**

*Maintenance of differentiation potential of human bone marrow mesenchymal stem cells immortalized by human telomerase reverse transcriptase gene despite [corrected] extensive proliferation.*

Biochem Biophys Res Commun. 2005 Jan 21;326(3):527-38.

**Abdel-Azim GA, Freeman AE, Kehrli ME Jr, Kelm SC, Burton JL, Kuck AL, Schnell S.**

*Genetic basis and risk factors for infectious and noninfectious diseases in US Holsteins. I. Estimation of genetic parameters for single diseases and general health.*

J Dairy Sci. 2005 Mar;88(3):1199-207.

**Abul KA, Andrew HL, Pillai S.** *Immunologia cellulare e molecolare*, settima edizione, Elsevier 2010.

**Agbulut O, Mazo M, Bressolle C, Gutierrez M, Azarnoush K, Sabbah L, Niederlander N, Abizanda G, Andreu EJ, Pelacho B, Gavira JJ, Perez-Ilzarbe M, Peyrard S, Bruneval P, Samuel JL, Soriano-Navarro M, García-Verdugo JM, Hagège AA, Prósper F, Menasché P.**

*Can bone marrow-derived multipotent adult progenitor cells regenerate infarcted myocardium?*

Cardiovascular Research 72 (2006) 175–183.

**Aird WC.** *Endothelial biomedicine*. Science, 2008.

**Alberts B et al.** *Biologia molecolare della cellula*. Casa editrice Zanichelli, V edizione, 2009.

**Allison SK, Gur I, Lee WM, Katz SG.**

*Carotid Stenting: A Surgeon's Perspective.*

J Am Coll Surg. 2011 Mar 12. PMID: 21398155.

**Altschmied J, Haendeler J.**

*Thioredoxin-1 and endothelial cell aging: role in cardiovascular diseases*  
*Antioxid Redox Signal*

Antioxid Redox Signal 2009 Jul;11(7):1733-40.

**Andréoletti L, Hober D, Becquart P, Belaich S, Copin MC, Lambert V, Wattré P.**

*Experimental CVB3-induced chronic myocarditis in two murine strains: evidence of interrelationships between virus replication and myocardial damage in persistent cardiac infection.*

J Med Virol. 1997 Jun;52(2):206-14.

**Apte M, McGwin G Jr, Vilá LM, Kaslow RA, Alarcón GS, Reveille JD.**

*Associated factors and impact of myocarditis in patients with SLE from LUMINA, a multiethnic US cohort (LV).*

Rheumatology (Oxford). 2008 Mar;47(3):362-7.

**Aretz HT, Billingham ME, Edwards WD, et al.**

*Myocarditis: a histopathologic definition and classification.*

Am J Cardiovasc Pathol. 1987;1:3-14.

**Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R, Yamanishi K.**

*Persistence in the population: epidemiology and transmission.*

Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis. Cambridge: Cambridge University Press; 2007. PMID: 21348131 [PubMed]

**Baasner A, Dettmeyer R, Graebe M, Rissland J, Madea B.**

*PCR-based diagnosis of enterovirus and parvovirus B19 in paraffin-embedded heart tissue of children with suspected sudden infant death syndrome.*

Lab Invest. 2003 Oct;83(10):1451-5.

**Badorff C, Berkely N, Mehrotra S, Talhouk JW, Rhoads RE, Knowlton KU.**

*Enteroviral protease 2A directly cleaves dystrophin and is inhibited by a dystrophin-based substrate analogue.*

J Biol Chem. 2000 Apr 14;275(15):11191-7.



**Badorff C, Knowlton KU.**

*Dystrophin disruption in enterovirus-induced myocarditis and dilated cardiomyopathy: from bench to bedside.*

Med Microbiol Immunol. 2004 May;193(2-3):121-6.

**Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Osaki M, Kato T, Okochi H, Ochiya T.**

*Rapid hepatic fate specification of adipose-derived stem cells and their therapeutic potential for liver failure.*

J Gastroenterol Hepatol. 2009 Jan;24(1):70-7.

**Barnard DL, Hubbard VD, Smee DF, Sidwell RW, Watson KG, Tucker SP, Reece PA.**

*In vitro activity of expanded-spectrum pyridazinyl oxime ethers related to pirodavir: novel capsid-binding inhibitors with potent antipicornavirus activity.*

Antimicrob Agents Chemother. 2004 May;48(5):1766-72.

**Bassiouny AE, Nosseir MM, Zoheiry MK, Ameen NA, Abdel-Hadi AM, Ibrahim IM, Zada S, El-Deen AH, El-Bassiouni NE.**

*Differential expression of cell cycle regulators in HCV-infection and related hepatocellular carcinoma.*

World J Hepatol. 2010 Jan 27;2(1):32-41.

**Baughman KL.**

*Diagnosis of myocarditis: death of Dallas criteria.*

Circulation, 2006; 113:593-5.

**Becker M., Kleinsmith Lewis J., Hardin Jeff.** *Il mondo della cellula.* Edises, 2007.

**Beltrami AP, Cesselli D, Bergamin N, Marcon P, Rigo S, Puppato E, D'Aurizio F, Verardo R, Piazza S, Pignatelli A, Poz A, Baccarani U, Damiani D, Fanin R, Mariuzzi L, Finato N, Masolini P, Burelli S, Belluzzi O, Schneider C, Beltrami CA.**

*Multipotent cells can be generated in vitro from several adult human organs (heart, liver, and bone marrow).*

Blood. 2007 Nov 1;110(9):3438-46.

**Bergelson JM, Chan M, Solomon KR, St John NF, Lin H, Finberg RW.**

*Decay-accelerating factor (CD55), a glycosylphosphatidylinositol-anchored complement regulatory protein, is a receptor for several echoviruses.*  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Jun 21;91(13):6245-8.

**Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, Kurt-Jones EA, Krithivas A, Hong JS, Horwitz MS, Crowell RL, Finberg RW.**

*Isolation of a common receptor for Cocksackie B viruses and adenoviruses 2 and 5.* *Science.*  
Science. 1997 Feb 28;275(5304):1320-3.

**Betterle C.** *Le malattie autoimmuni.* Piccin, 2000.

**Bienzle D, MacDonald KS, Smaill FM, Kovacs C, Baqi M, Courssaris B, Luscher MA, Walmsley SL, Rosenthal KL.**

*Factors contributing to the lack of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) transmission in HIV-1-discordant partners.*  
J Infect Dis. 2000 Jul;182(1):123-32.

**Boniotto M, Braidà L, Pirulli D, Arraes L, Amoroso A, Crovella S.**

*MBL2 polymorphisms are involved in HIV-1 infection in Brazilian perinatally infected children.*

AIDS. 2003 Mar 28;17(5):779-80.

**Bowen DG, Walker CM.**

*Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection.*  
Nature. 2005 Aug 18;436(7053):946-52.

**Bowles RK, Gibson J, Wu J, Shaffer LG, Towbin JA, Bowles NE.**

*Genomic organization and chromosomal localization of the human Cocksackievirus B-adenovirus receptor gene.*

Hum Genet Jul 1999 ; 105:354–359.

**Bratincsák A, El-Said HG, Bradley JS, Shayan K, Grossfeld PD, Cannavino CR.**

*Fulminant myocarditis associated with pandemic H1N1 influenza A virus in children.*

J Am Coll Cardiol. 2010 Mar 2;55(9):928-9.

**Brown MG, Dokun AO, Heusel JW, Smith HR, Beckman DL, Blattenberger EA, Dubbelde CE, Stone LR, Scalzo AA, Yokoyama WM.**

*Vital involvement of a natural killer cell activation receptor in resistance to viral infection.*

Science. 2001 May 4;292(5518):934-7.

**Calabrese LH, Albrecht M, Young J, McCarthy P, Haug M, Jarcho J, Zackin R.**

*Successful cardiac transplantation in an HIV-1-infected patient with advanced disease.*

N Engl J Med. 2003 Jun 5;348(23):2323-8.

**Caras IW.**

*An internally positioned signal can direct attachment of a glycosphospholipid membrane anchor.*

J Cell Biol. 1991 Apr;113(1):77-85.

**Carey BR, McGowan LK, Schuster GM.**

*Medical microbiology for the new curriculum: a case-based approach.* Wiley, 2008.

**Carson SD, Kim KS, Pirruccello SJ, Tracy S, Chapman NM.**

*Endogenous low-level expression of the coxsackievirus and adenovirus receptor enables coxsackievirus B3 infection of RD cells.*

J Gen Virol 88:3031-3038, 2007.

**Caruso L, Yuen S, Smith J, Husain M, Opavsky MA.**

*Cardiomyocyte-targeted overexpression of the coxsackie-adenovirus receptor causes a cardiomyopathy in association with  $\beta$ -catenin signaling.*

Journal of Molecular and Cellular Cardiology 48 (2010) 1194–1205.

**Chen Y, Ke Q, Xiao YF, Wu G, Kaplan E, Hampton TG, Malek S, Min JY, Amende I, Morgan JP.**

*Cocaine and catecholamines enhance inflammatory cell retention in the coronary circulation of mice by upregulation of adhesion molecules.*

Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2005 May;288(5):H2323-31.

**Cheney KM, McKnight Á.**

*Interferon-alpha mediates restriction of human immunodeficiency virus type-1 replication in primary human macrophages at an early stage of replication.*  
PLoS One. 2010 Oct 20;5(10):e13521.

**Cheung C, Marchant D, Walker EK, Luo Z, Zhang J, Yanagawa B, Rahmani M, Cox J, Overall C, Senior RM, Luo H, McManus BM.**

*Ablation of matrix metalloproteinase-9 increases severity of viral myocarditis in mice.*  
Circulation. 2008 Mar 25;117(12):1574-82.

**Chevaliez S, Pawlotsky JM.**

*HCV Genome and Life Cycle.*

Tan SL, editor. Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology. Norfolk (UK): Horizon Bioscience; 2006. Chapter 1.

**Cohen CJ, Shieh JT, Pickles RJ.**

*The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction.*  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. Oct 2001; 98 (26): 15191–6.

**Cohen CJ, Shieh JT, Pickles RJ, Okegawa T, Hsieh JT, Bergelson JM.**

*The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction.*  
Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Dec 18;98(26):15191-6.

**Conti G, Iannuzzi E, Imperatore F.** *Terapia Intensiva.* Elsevier Masson, 2007.

**Cook MM, Kollar K, Brooke GP, Atkinson K.**

*Cellular therapy for repair of cardiac damage after acute myocardial infarction.*  
Int J Cell Biol. 2009;2009:906507.

**Cooper LT.**

*Le tre fasi della miocardite.*  
Jr, MD, 2009.

**Coyne CB, Bergelson JM.**

*Virus-induced Abl and Fyn kinase signals permit coxsackievirus entry through epithelial tight junctions.*

Cell. 2006 Jan 13;124(1):119-31.

**Crea F.** *Malattie del cuore di Braunwald. Trattato di medicina cardiovascolare.* Elsevier masson, 2007.

**Dale WJ, Von Schantz M.** *Dai geni ai genomi.* Edises, 2009.

**Dalldorf G, MD , Sickles Grace M, Plager HMD, Gifford R, DVM.**

*A virus recovered from the feces of "poliomyelitis" patients pathogenic for suckling mice.*

J Exp Med. 1949 Jun 1;89(6):56

**Dalldorf G, MD.**

*The sparing effect of coxsackie virus infection on experimental poliomyelitis.*

J Exp Med. 1951 Jul 1;94(1):65-71.

**Dalldorf G, MD.**

*The Coxsackie Virus.*

Bull N Y Acad Med. 1950 May;26(5):329-35.

**Dalldorf G, MD.**

*Bornholm disease.*

Br Med J Aug. 1953 1;2 (4830); 287-8.

**Daniels G.** *Human blood groups.* Blackwell publishing, 2002.

**Davidson C, Desiderio F.** *Angina e Infarto.* BMA, 2008.

**Dec GW Jr, Palacios IF, Fallon JT, Aretz HT, Mills J, Lee DC, Johnson RA.**

*Active myocarditis in the spectrum of acute dilated cardiomyopathies. Clinical features, histologic correlates, and clinical outcome.*

N Engl J Med. 1985 Apr 4;312(14):885-90.

**Dennert R, Crijns HJ, Heymans S.**

*Acute viral myocarditis.*

Eur Heart J. 2008 Sep;29(17):2073-82. Epub 2008 Jul 9.

**Dennert R, Velthuis S, Westermann D, Donker D, Schalla S, van Suylen RJ, Heymans S.**

*Parvovirus-B19-associated fulminant myocarditis successfully treated with immunosuppressive and antiviral therapy.*

Antivir Ther. 2010;15(4):681-5.

**Depatie C, Muise E, Lepage P, Gros P, Vidal SM.**

*High-resolution linkage map in the proximity of the host resistance locus Cmv1.*  
Genomics. 1997 Jan 15;39(2):154-63.

**Dermody TS, Kirchner E, Guglielmi KM, Stehle T.**

*Immunoglobulin Superfamily Virus Receptors and the Evolution of Adaptive Immunity.*

PLoS Pathog. 2009 November; 5(11): e1000481.

**De Souza PR, Arraes LC, de Lima Filho JL, Bruneska D, Milanese M, Crovella S.**

J Immunol. 2007 Jan 1;178(1):352-9.

**Henke A, Huber S, Stelzner A, Whitton JL.**

*The role of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in coxsackievirus B3-induced myocarditis.*

J Virol. 1995 Nov;69(11):6720-8.

**Ho M.**

*Advances in understanding cytomegalovirus infection after transplantation CCR5 promoter polymorphisms and HIV-1 perinatal transmission in Brazilian children.*

J Reprod Immunol. 2006 Feb;69(1):77-84. Epub 2005 Oct 17.

**Ellis CR, Di Salvo T.**

*Myocarditis: basic and clinical aspects.*  
Cardiol Rev. 2007 Jul-Aug;15(4):170-7.

**Excoffon KJ, Traver GL, Zabner J.**

*The role of the extracellular domain in the biology of the coxsackievirus and adenovirus receptor.*

Am J Respir Cell Mol Biol. 2005 Jun;32(6):498-503. Epub 2005 Mar 18.

**Excoffon KJ, Gansemer ND, Mobily ME, Karp PH, Parekh KR.**

*Isoform-Specific Regulation and Localization of the Cocksackie and Adenovirus Receptor in Human Airway Epithelia.*

PLoS ONE 5(3): e9909 March 26, 2010.

**Fairweather D, Rose NR.**

*Coxsackievirus-induced myocarditis in mice: a model of autoimmune disease for studying immunotoxicity.*

Methods. 2007 Jan;41(1):118-22.

**Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball La.** *Virus Taxonomy: classification and nomenclature of viruses.* Elsevier, 2005.

**Feldman AM, McNamara D.**

*Myocarditis.*

N Engl J Med. 2000 Nov 9;343(19):1388-98.

**Fok PT, Huang KC, Holland PC, Nalbantoglu J.**

*The Cocksackie and adenovirus receptor binds microtubules and plays a role in cell migration.*

J Biol Chem. 2007 Mar 9;282(10):7512-21.

**Forte G, Carotenuto F, Pagliari F, Pagliari S, Cossa P, Fiaccavento R, Ahluwalia A, Vozzi G, Vinci B, Serafino A, Rinaldi A, Traversa E, Carosella L, Minieri M, Di Nardo P.**

*Criticality of the biological and physical stimuli array inducing resident cardiac stem cell determination.*

Stem Cells. 2008 Aug;26(8):2093-103. Epub 2008 May 22.

**Forte G, Franzese O, Pagliari S, Pagliari F, Di Francesco AM, Cossa P, Laudisi A, Fiaccavento R, Minieri M, Bonmassar E, Di Nardo P.**

*Interfacing Sca-1(pos) mesenchymal stem cells with biocompatible scaffolds with different chemical composition and geometry.*

J Biomed Biotechnol. 2009;2009:910610.

**Franceschi RT.**

*The role of ascorbic acid in mesenchymal differentiation.*

Nutr Rev. 1992 Mar;50(3):65-70.

**Freimuth P, Springer K, Berard C, Hainfeld J, Bewley M, Flanagan J.**

*Coxsackievirus and adenovirus receptor amino-terminal immunoglobulin V-related domain binds adenovirus type 2 and fiber knob from adenovirus type 12.*

J Virol. 1999 Feb;73(2):1392-8.

**Gao F et al**

*Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan troglodytes troglodytes.*

Nature. 1999 Feb 4;397(6718):385-6.

**Giraud P, Cosset JM.**

*Radiation toxicity to the heart: physiopathology and clinical data.*

Bull Cancer. 2004 Nov 1;91 Suppl 3:147-53.

**Gray GC, McCarthy T, Lebeck MG, Schnurr DP, Russell KL, Kajon AE, Landry ML, Leland DS, Storch GA, Ginocchio CC, Robinson CC, Demmler GJ, Saubolle MA, Kehl SC, Selvarangan R, Miller MB, Chappell JD, Zerr DM, Kiska DL, Halstead DC, , Capuano AW, Chorazy ML, Dawson JD, Erdman DD.**



*Genotype prevalence and risk factors for severe clinical adenovirus infection, United States 2004-2006.*

Clin Infect Dis .2007 Nov 1;45(9):1120-31.

**Gonzalez-Mariscal L, Garay E, Lechuga S.**

*Virus interaction with the apical junctional complex.*

Frontiers in Bioscience 14, 731-768, January 1, 2009.

**Harris CL, Pettigrew DM, Lea SM, Morgan BP.**

*Decay-accelerating factor must bind both components of the complement alternative pathway C3 convertase to mediate efficient decay.*

Transplant Proc. 1994 Oct;26(5 Suppl 1):7-11.

**Ho M.**

*Advances in understanding cytomegalovirus infection after transplantation.*

Transplant Proc. 1994 Oct;26(5 Suppl 1):7-11.

**Hoofnagle JH.**

*Course and outcome of hepatitis C.*

Hepatology. 2002 Nov;36(5 Suppl 1):S21-9

**Huang G, Zheng Q, Sun J, Guo C, Yang J, Chen R, Xu Y, Wang G, Shen D, Pan Z, Jin J, Wang J.**

*Stabilization of cellular properties and differentiation multipotential of human mesenchymal stem cells transduced with hTERT gene in a long-term culture.*

J Cell Biochem. 2008 Mar 1;103(4):1256-69.

**Ishikawa T, Zhu BL, Li DR, Zhao D, Maeda H.**

*Epstein-Barr virus myocarditis as a cause of sudden death: two autopsy cases.*

Int J Legal Med. 2005 Jul;119(4):231-5.

**Ito M, Kodama M, Masuko M, Yamaura M, Fuse K, Uesugi Y, et al**

*Expression of coxsackievirus and adenovirus receptor in hearts of rats with experimental autoimmune myocarditis.*

Circ Res 2000;86:275–80.

**Johnson WE.**

*Endless forms most viral*

PLoS Genet. 2010 Nov 18;6(11):e1001210.

**Jülg B, Goebel FD.**

*HIV genetic diversity: any implications for drug resistance?*  
Infection. 2005 Aug;33(4):299-301.

**Kacprzac-Bergman I, Nowakowska B.**

*Influence of genetics factors on the susceptibility to HBV infection, its clinical pictures and responsiveness to HBV vaccination.*  
Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2005 Mar-Apr 53(2):139-42.

**Kamatani Y, Wattanapokayakit S, Ochi H, Kawaguchi T, Takahashi A, Hosono N, Kubo M, Tsunoda T, Kamatani N, Kumada H, Puseenam A, Sura T, Daigo Y, Chayama K, Chantratita W, Nakamura Y, Matsuda K.**

*A genome-wide association study identifies variants in the HLA-DP locus associated with chronic hepatitis B in Asians.*  
Nat Genet. 2009 May;41(5):591-5.

**Kishimoto C, Hiraoka Y, Takamatsu N, Takada H, Kamiya H, Ochiai H.**

*An in vivo model of autoimmune post-coxsackievirus B3 myocarditis in severe combined immunodeficiency mouse.*  
J Virol. 2010 Jun;84(12):5868-79.

**Klingel K, Hohenadl C, Canu A, Albrecht M, Seemann M, Mall G, Kandolf R.**

*Ongoing enterovirus-induced myocarditis is associated with persistent heart muscle infection: quantitative analysis of virus replication, tissue damage, and inflammation.*  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Jan 1;89(1):314-8.

**Klingel K, Selinka HC, Huber M, Sauter M, Leube M, Kandolf R.**

*Molecular pathology and structural features of enteroviral replication. Toward understanding the pathogenesis of viral heart disease.*

Herz. 2000 May;25(3):216-20.

**Klug WS, Charlotte A, Spencer CA.** *Concetti di genetica, ottava edizione.* Pearson, 2007.

**Kodama M.**

*Influenza myocarditis.*

Circ J. 2010 Oct;74(10):2060-1.

**Kohtz DS, Cole F, Wong ML, Hsu MT.**

*Infection and inhibition of differentiation of human fetal skeletal myoblasts by adenovirus.*

Virology. 1991 Oct;184(2):569-79.

**Knowlton KU, Badorff C.**

*The immune system in viral myocarditis: maintaining the balance.*

Circ Res. 1999 Sep 17;85(6):559-61.

**Krishnan A, Molina A, Zaia J, Smith D, Vasquez D, Kogut N, Falk PM, Rosenthal J, Alvarnas J, Forman SJ.**

*Durable remissions with autologous stem cell transplantation for high-risk HIV-associated lymphomas.*

Blood. 2005 Jan 15;105(2):874-8.

**Kühl U, Pauschinger M, Noutsias M, Seeberg B, Bock T, Lassner D, Poller W, Kandolf R, Schultheiss HP.**

*High prevalence of viral genomes and multiple viral infections in the myocardium of adults with "idiopathic" left ventricular dysfunction.*

Circulation. 2005 Feb 22;111(7):887-93.

**Kühl U, Pauschinger M, Seeberg B, Lassner D, Noutsias M, Poller W, Schultheiss HP.**

*Viral persistence in the myocardium is associated with progressive cardiac dysfunction.*

Circulation. 2005 Sep 27;112(13):1965-70.

**La Placa M et al.** *Principi di Microbiologia Medica*, XI edizione. Esculapio, 2008.

**Lang PA, Recher M, Häussinger D, Lang KS.**

*Genes determining the course of virus persistence in the liver: lessons from murine infection with lymphocytic choriomeningitis virus.*

Cell Physiol Biochem. 2010;26(3):263-72.

**Lauer B, Padberg K, Schultheiss HP, Strauer BE.**

*Autoantibodies against human ventricular myosin in sera of patients with acute and chronic myocarditis.*

J Am Coll Cardiol. 1994 Jan;23(1):146-53.

**Lee MH, Yang HI, Jen CL, Lu SN, Yeh SH, Liu CJ, You SL, Sun CA, Wang LY, Chen WJ, Chen CJ.**

*Community and personal risk factors for hepatitis C virus infection: a survey of 23 820 residents in Taiwan in 1991-2.*

Gut. 2010 Nov 10. [Epub ahead of print] PMID: 21068131 [PubMed - as supplied by publisher].

**Lewin B.** Il gene VIII. Zanichelli, 2004.

**Leipner C, Grün K, Schneider I, Glück B, Sigusch HH, Stelzner A.**

*Coxsackievirus B3-induced myocarditis: differences in the immune response of C57BL/6 and Balb/c mice.*

Med Microbiol Immunol. 2004 May;193(2-3):141-7.

**Li J, Leschka S, Rutschow S, Schwimmbeck PL, Husmann L, Noutsias M, Westermann D, Poller W, Zeichhardt H, Klingel K, Tschöpe C, Schultheiss HP, Pauschinger M.**

*Immunomodulation by interleukin-4 suppresses matrix metalloproteinases and improves cardiac function in murine myocarditis.*

Eur J Pharmacol. 2007 Jan 5;554(1):60-8.

**Li M, Song R, Masciotra S, Soriano V, Spira TJ, Lal RB, Yang C.**

*Association of CCR5 human haplogroup E with rapid HIV type 1 disease progression.*

AIDS Res Hum Retroviruses. 2005 Feb;21(2):111-5.

**Li HY, Li YH, Zhu TJ.**

*The expression of coxsackie B virus adenovirus receptor (CAR) in viral myocarditis and dilated cardiomyopathy patients.*

J Forensic Med. (Chin) 2007 Aug;23(4):247-9.

**Li Y, Bourlet T, Andreoletti L, Mosnier JF, Peng T, Yang Y, Archard LC, Pozzetto B, Zhang H.**

*Enteroviral capsid protein VP1 is present in myocardial tissues from some patients with myocarditis or dilated cardiomyopathy.*

Circulation. 2000 Jan 25;101(3):231-4.

**Lim BK, Choi JH, Nam JH, Gil CO, Shin JO, Yun SH, Kim DK, Jeon ES.**

*Virus receptor trap neutralizes coxsackievirus in experimental murine viral myocarditis.*

Cardiovasc Res. 2006 Aug 1;71(3):517-26.

**Lim BK, Xiong D, Dorner A, Youn TJ, Yung A, Liu TI, Gu Y, Dalton ND, Wright AT, Evans SM, Chen J, Peterson KL, McCulloch AD, Yajima T, Knowlton KU.**

*Coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) mediates atrioventricular-node function and connexin 45 localization in the murine heart.*

J Clin Invest. 2008 Aug;118(8):2758-70.

**Lin S, Wang XM, Nadeau PE, Mergia A.**

*HIV infection upregulates caveolin 1 expression to restrict virus production.*

J Virol. 2010 Sep;84(18):9487-96. J Cell Biol.

**Lindner J, Noutsias M, Lassner D, Wenzel J, Schultheiss HP, Kuehl U, Modrow S.**

*Adaptive immune responses against parvovirus B19 in patients with myocardial disease.*

J Clin Virol. 2009 Jan;44(1):27-32.

**Lippincott William, Lippincott Wilkins.** *Lippincott's guide to infectious disease.*

Wolters Kluwer, 2010.

**Liu PP, Mason JW.**

*Advances in the understanding of myocarditis.*

Circulation. 2001 Aug 28;104(9):1076-82.

**Liu PP, Opavsky MA.**

*Viral myocarditis: receptors that bridge the cardiovascular with the immune system?*

Circ Res. 2000 Feb 18;86(3):253-4.

**Liu PP et al.,**

*Braunwald's Heart Disease.*

Philadelphia, Pa: WB Saunders; 459-470, 2003.

**Luo H, Wong J, Wong B.**

*Protein degradation systems in viral myocarditis leading to dilated cardiomyopathy.*

Cardiovasc Res. 2010 Jan 15;85(2):347-56.

**Jessup M, Brozena S.**

*Heart failure.*

N Engl J Med. 2003 May 15;348(20):2007-18.

**Jülg B, Goebel FD.**

*HIV genetic diversity: any implications for drug resistance?*

Infection. 2005 Aug;33(4):299-301.

**Thoelen I, Magnusson C, Tågerud S, Polacek C, Lindberg M, Van Kacprzak-Bergman I, Nowakowska B.**

*Influence of genetic factors on the susceptibility to HBV infection, its clinical pictures, and responsiveness to HBV vaccination.*

Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2005 Mar-Apr;53(2):139-42.

**Kandolf R.**

*Virus etiology of inflammatory cardiomyopathy.*

Dtsch Med Wochenschr. 2004 Oct 8;129(41):2187-92.

**Kim YJ, Lee HS.**

*Single nucleotide polymorphisms associated with hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B virus infection.*

Intervirology. 2005 Jan-Feb;48(1):10-5.

**Knowlton KU, Badorff C.**

*The immune system in viral myocarditis: maintaining the balance.*

Circ Res. 1999 Sep 17;85(6):559-61.

**Kohtz DS, Cole F, Wong ML, Hsu MT.**

*Infection and inhibition of differentiation of human fetal skeletal myoblasts by adenovirus.*

Virology. 1991 Oct;184(2):569-79.

**Krishnan A, Molina A, Zaia J, Smith D, Vasquez D, Kogut N, Falk PM, Rosenthal J, Alvarnas J, Forman SJ.**

*Durable remissions with autologous stem cell transplantation for high-risk HIV-associated lymphomas.*

Blood. 2005 Jan 15;105(2):874-8.

**Kühl U, Pauschinger M, Noutsias M, Seeberg B, Bock T, Lassner D, Poller W, Kandolf R, Schultheiss HP.**

*High prevalence of viral genomes and multiple viral infections in the myocardium of adults with "idiopathic" left ventricular dysfunction.*  
Circulation. 2005 Feb 22;111(7):887-93.

**Kühl U, Pauschinger M, Seeberg B, Lassner D, Noutsias M, Poller W, Schultheiss HP.**

*Viral persistence in the myocardium is associated with progressive cardiac dysfunction.*  
Circulation. 2005 Sep 27;112(13):1965-70.

**Kuo TK, Hung SP, Chuang CH, Chen CT, Shih YR, Fang SC, Yang VW, Lee OK.**

*Stem cell therapy for liver disease: parameters governing the success of using bone marrow mesenchymal stem cells.*  
Gastroenterology. 2008 Jun;134(7):2111-21, 2121.e1-3.

**Macsween KF, Crawford DH.**

Epstein-Barr virus-recent advances.  
Lancet Infect Dis. 2003 Mar;3(3):131-40.

**Maekawa Y, Ouzounian M, Opavsky MA, Liu PP.**

*Connecting the missing link between dilated cardiomyopathy and viral myocarditis: virus, cytoskeleton, and innate immunity.*  
Circulation. 2007 Jan 2;115(1):5-8.

**Mahrholdt H, Wagner A, Deluigi CC, Kispert E, Hager S, Meinhardt G, Vogelsberg H, Fritz P, Dippón J, Bock CT, Klingel K, Kandolf R, Sechtem U.**

*Presentation, patterns of myocardial damage, and clinical course of viral myocarditis.*  
Circulation. 2006 Oct 10;114(15):1581-90.

**Maier R, Krebs P, Ludewig**

*Immunopathological basis of virus-induced myocarditis.*  
Clin Dev Immunol. 2004 Mar;11(1):1-5.

**Male D, Brostoff J, Roth BD, Roitt I.** *Immunology*, settima edizione, Mosby Elsevier 2006.

**Mariottini GL, Capicchioni V, Guida L, Mattioli F, Penco S, Rmano P, Scarabelli S.**

*Introduzione alle colture cellulari, metodiche relative.*  
Morgan Edizioni Techniche, 2003.

**Martino TA, Liu P, Sole MJ.**

*Viral infection and the pathogenesis of dilated cardiomyopathy.*  
Circ Res. 1994 Feb;74(2):182-8

**Martino TA, Petric M, Brown M, Aitken K, Gauntt CJ, Richardson CD, Chow LH, Liu PP.**

*Cardiovirulent coxsackieviruses and the decay-accelerating factor (CD55) receptor.*  
Virology. 1998 May 10;244(2):302-14.

**Martino TA, Petric M, Weingartl H, Bergelson JM, Opavsky MA, Richardson CD, Modlin JF, Finberg RW, Kain KC, Willis N, Gauntt CJ, Liu PP.**

*The coxsackie-adenovirus receptor (CAR) is used by reference strains and clinical isolates representing all six serotypes of coxsackievirus group B and by swine vesicular disease virus.*  
Virology. 2000 May 25;271(1):99-108.

**Matsumori A, Yamada T, Suzuki H, et al.**

*Increased circulating cytokines in patients with myocarditis and cardiomyopathy.*  
Br Heart J. 1994; 72:561–566.

**Matsumori A, Shimada T, Chapman NM, Tracy SM, Mason JW.**

*Myocarditis and heart failure associated with hepatitis C virus infection.*  
J Card Fail. 2006 May;12(4):293-8.

**Matsumoto Y, Park IK, Kohyama K.**

*Matrix metalloproteinase (MMP)-9, but not MMP-2, is involved in the development and progression of C protein-induced myocarditis and subsequent dilated cardiomyopathy.*  
J Immunol. 2009 Oct 1;183(7):4773-81.

**Matteoli Barbara, Albonici Loredana, Forte Giancarlo, Bontempo Lucia, Scaccino Antonio, Rosati Antonella, Cambi Christian, Gabriele Mario, Fommei Enza, Manzari Vittorio, Di Nardo Paolo and Luca Ceccherini-Nelli.**



*Should viral un-infectibility be an additional required characteristic of a deliverable adult progenitor cell?*  
2011.

**McCarthy RE, Boehmer JP, Hruban RH, Hutchins GM, Kasper EK, Hare JM, Baughman KL.**

*Long-term outcome of fulminant myocarditis as compared with acute (nonfulminant) myocarditis.*  
N Engl J Med. 2000 Mar 9;342(10):690-5.

**McWilliam Leitcha EC, Harvala H, Robertsona I, Ubillosa I, Templetonb K, Simmondsa P.**

*Direct identification of human enterovirus serotypes in cerebrospinal fluid by amplification and sequencing of the VP1 region.*  
Journal of Clinical Virology 44 (2009) 119–124.

**Meyer SA, Gandhi CD, Johnson DM, Winn HR, Patel AB.**

*Outcomes of carotid artery stenting in high-risk patients with carotid artery stenosis: a single neurovascular center retrospective review of 101 consecutive patients.*  
Neurosurgery. 2010 Mar; 66(3): 448-53; 453-4.

**Molina A, Zaia J, Krishnan A.**

*Treatment of human immunodeficiency virus-related lymphoma with haematopoietic stem cell transplantation.*  
Blood Rev. 2003 Dec;17(4):249-58.

**Moroni M, Esposito R, De Lalla F.** *Malattie Infettive.*  
Elsevier, 2008.

**Moroni M, Antorini S, Vullo V.** *Manuale di malattie infettive.*  
Elsevier Masson, 2009.

**Mouiseddine M, François S, Semont A, Sache A, Allenet B, Mathieu N, Frick J, Thierry D, Chapel A.**

*Human mesenchymal stem cells home specifically to radiation-injured tissues in a non-obese diabetes/severe combined immunodeficiency mouse model.*  
Br J Radiol. 2007 Sep;80 Spec No 1:S49-55.

**Mueller A, Kelly E, Strange PG.**

*Pathways for internalization and recycling of the chemokine receptor CCR5.*

Blood. 2002 Feb 1;99(3):785-91.

**Nigro G, Bastianon V, Colloridi V, Ventriglia F, Gallo P, D'Amati G, Koch WC, Adler SP.**

*Human parvovirus B19 infection in infancy associated with acute and chronic lymphocytic myocarditis and high cytokine levels: report of 3 cases and review.*  
Clin Infect Dis. 2000 Jul;31(1):65-9.

**Noutsias M, Fechner H, de Jonge H, Wang X, Dekkers D, Houtsmuller AB, Pauschinger M, Bergelson J, Warraich R, Yacoub M, Hetzer R, Lamers J, Schultheiss HP, Poller W.**

*Human coxsackie-adenovirus receptor is colocalized with integrins alpha(v)beta(3) and alpha(v)beta(5) on the cardiomyocyte sarcolemma and upregulated in dilated cardiomyopathy: implications for cardiotropic viral infections.*  
Circulation. 2001 Jul 17;104(3):275-80.

**Nsaibia S, Wagner S, Rondé P, Warter JM, Poindron P, Aouni M, Dorchie OM.**

*The difficult-to-cultivate coxsackieviruses A can productively multiply in primary culture of mouse skeletal muscle.*  
Virus Res. 2007 Jan;123(1):30-9.

**Oberste MS, Pallansch MA.**

*Establishing evidence for enterovirus infection in chronic disease.*  
Ann N Y Acad Sci. 2003 Nov;1005:23-31.

**O'Hare MJ, Bond J, Clarke C, Takeuchi Y, Atherton AJ, Berry C, Moody J, Silver AR, Davies DC, Alsop AE, Neville AM, Jat PS.**

*Conditional immortalization of freshly isolated human mammary fibroblasts and endothelial cells.*  
Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Jan 16;98(2):646-51.

**Osuka F, Endo Y, Higuchi M, Suzuki H, Shio Y, Fujiu K, Kanno R, Oishi A, Terashima M, Fujita T, Gotoh M.**

*Molecular cloning and characterization of novel splicing variants of human decay-accelerating factor.*  
Genomics. 2006 Sep;88(3):316-22.

**Park JH, Kim DS, Cho YJ, Kim YJ, Jeong SY, Lee SM, Cho SJ, Yun CW, Jo I, Nam JH.**

*Attenuation of coxsackievirus B3 by VP2 mutation and its application as a vaccine against virus-induced myocarditis and pancreatitis.*  
Vaccine. 2009 Mar 18;27(13):1974-83.

**Parrillo JE, Aretz HT, Palacios I, Fallon JT, Block PC.**

*The results of transvenous endomyocardial biopsy can frequently be used to diagnose myocardial diseases in patients with idiopathic heart failure. Endomyocardial biopsies in 100 consecutive patients revealed a substantial incidence of myocarditis.*  
Circulation. 1984 Jan;69(1):93-101.

**Patel KP, Coyne CB, Bergelson JM.**

*Dynamin- and lipid raft-dependent entry of decay-accelerating factor (DAF)-binding and non-DAF-binding coxsackieviruses into nonpolarized cells.*

J Virol. 2009 Nov;83(21):11064-77. Epub 2009 Aug 26.

**Pauschinger M, Bowles NE, Fuentes-Garcia FJ, Pham V, Kühl U, Schwimmbeck PL, Schultheiss HP, Towbin JA.**

*Detection of adenoviral genome in the myocardium of adult patients with idiopathic left ventricular dysfunction.*  
Circulation. 1999 Mar 16;99(10):1348-54.

**Pauschinger M, Doerner A, Kuehl U, Schwimmbeck PL, Poller W, Kandolf R, Schultheiss HP.**

*Enteroviral RNA replication in the myocardium of patients with left ventricular dysfunction and clinically suspected myocarditis.*  
Circulation. 1999;99:889-895.

**Patzke C, Max KE, Behlke J, Schreiber J, Schmidt H, Dorner AA, Kröger S, Henning M, Otto A, Heinemann U, Rathjen.**

*The Coxsackievirus-Adenovirus Receptor reveals complex homophilic and heterophilic interactions on neural cells.*  
Journal of Neuroscience 2010 Feb;30 (8): 2897-2910.

**Pavone P, Fioranelli M.** *Malattia Coronarica: Fisiopatologia e Diagnostica non invasiva con TC.* Springer, 2008.

**Picton AC, Paximadis M, Tiemessen CT.**

*Genetic variation within the gene encoding the HIV-1 CCR5 coreceptor in two South African populations.*

Infect Genet Evol. 2010 May;10(4):487-94.

**Polesello A, Guenzi S, Polesello S.**

Attrezzature e kit per il laboratorio chimico e biologico. Morgan Edizioni Tecniche, 2006.

**Poller W, Fechner H, Noutsias M, Tschoepe C, Schultheiss HP.**

*Highly variable expression of virus receptors in the human cardiovascular system. Implications for cardiotropic viral infections and gene therapy.*  
Z Kardiol. 2002 Dec;91(12):978-91.

**Poli G.**

*Microbiologia e Immunologia*, UTET 1991.

**Prati D, Poli F, Farma E, Picone A, Porta E, De Mattei C, Zanella A, Scalamogna M, Gamba A, Gronda E, Faggian G, Livi U, Puricelli C, Viganò M, Sirchia G.**

*Multicenter study on hepatitis C virus infection in patients with dilated cardiomyopathy. North Italy Transplant Program (NITP).*  
J Med Virol. 1999 Jun;58(2):116-20.

**Prochorec-Sobieszek M, Bilińska ZT, Grzybowski J, Mazurkiewicz L, Skwarek M, Walczak E, Michalak E, Cedro K, Chmielak Z, Debski A, Demkow M, Witkowski A, Wagner T, Ruzyllo W.**

*Assessment of the inflammatory process by endomyocardial biopsy in patients with dilated cardiomyopathy based on pathological and immunohistochemical methods*  
Kardiol Pol. 2006 May; 64(5):479-87; discussion 488.

**Rezkalla SH, Kloner RA.**

*Influenza-related viral myocarditis.*  
WMJ. 2010 Aug;109(4):209-13.

**Rohayem J, Dinger J, Fischer R, Klingel K, Kandolf R, Rethwilm A.**

*Fatal myocarditis associated with acute parvovirus B19 and human herpesvirus 6 coinfection.*  
J Clin Microbiol. 2001 Dec;39(12):4585-7.

**Roland ME, Adey D, Carlson LL, Terrault NA.**

*Kidney and liver transplantation in HIV-infected patients: case presentations and review.*

AIDS Patient Care STDS. 2003 Oct;17(10):501-7.

**Rosenberg NA.**

*Standardized subsets of the HGDP-CEPH Human Genome Diversity Cell Line Panel, accounting for atypical and duplicated samples and pairs of close relatives.*

Ann Hum Genet. 2006 Nov;70(Pt 6):841-7.

**Sasse A, Wallich M, Ding Z, Goedecke A, Schrader J.**

*Coxsackie-and-adenovirus receptor mRNA expression in human heart failure.*

J Gene Med 2003;5:876–82.

**Scassa ME, de Giusti CJ, Questa M, Pretre G, Richardson GA, Bluguermann C, Romorini L, Ferrer MF, Sevlever GE, Miriuka SG, Gómez RM.**

*Human embryonic stem cells and derived contractile embryoid bodies are susceptible to Coxsackievirus B infection and respond to interferon I $\beta$  treatment.*  
*Stem Cell Res. 2010 Sep 18.*

**Selinka HC, Sauter AWM, Kandolf R, Klingel K.**

*Virus-receptor interactions of coxsackie B viruses and their putative influence on cardiotropism.*

Med Microbiol Immunol. 2004; 193: 127–131.

**Sémiramoth N, Gleizes A, Turbica I, Sandré C, Marin-Esteban V, Gorges R, Servin A, Chollet-Martin S.**

*Afa/Dr-expressing, diffusely adhering Escherichia coli strain C1845 triggers F1845 fimbria-dependent phosphatidylserine externalization on neutrophil-like differentiated PLB-985 cells through an apoptosis-independent mechanism.*

Infect Immun. 2010 Jul;78(7):2974-83.

**Schipani E, Kronenberg HM.**

*Adult mesenchymal stem cells.*

StemBook [Internet]. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute; 2008-2009 Jan 31.

**Schönian U, Crombach M, Maisch B.**

*Assessment of cytomegalovirus DNA and protein expression in patients with myocarditis.*

Clin Immunol Immunopathol. 1993 Aug;68(2):229-33.

**Sghirlanzoni A.** *Terapia delle malattie neurologiche.* Springer Lusofarmaco, 2010.

**Shaw AC, Holland PC, Sinnreich M, Allen C, Sollerbrant K, Karpati G and Nalbantoglu J.**

*Isoform-specific expression of the Coxsackie and adenovirus receptor (CAR) in neuromuscular junction and cardiac intercalated discs.*

BMC Cell Biol. 2004 Nov 8;5(1):42.

**Simanek AM, Dowd JB, Pawelec G, Melzer D, Dutta A, Aiello AE.**

*Seropositivity to cytomegalovirus, inflammation, all-cause and cardiovascular disease-related mortality in the United States.*

PLoS One. 2011 Feb 17;6(2):e16103.

**Simmonds P, Templeton K, Ubbilos I, Robertson H, Harvala H, McWilliam EC Leitch.**

*Direct Identification of human enterovirus serotypes in cerebrospinal fluid by amplification and sequencing of the VP1 region.*

Journal of Clinical Virology 44 (2009) 119-124.

**Singh KK, Hughes MD, Chen J, Phiri K, Rousseau C, Kuhn L, Coutoudis A, Jackson JB, Guay LA, Musoke P, Mmiro F, Semba RD, Spector SA.**

*Associations of chemokine receptor polymorphisms With HIV-1 mother-to-child transmission in sub-Saharan Africa: possible modulation of genetic effects by antiretrovirals.*

J Acquir Immune Defic Syndr. 2008 Nov 1;49(3):259-65.

**Sollerbrant K, Mirza M, Petersen C, Nordqvist K.**

*Coxsackievirus and adenovirus receptor is up-regulated in migratory germ cells during passage of the blood-testis barrier.*

Endocrinology. 2007 Nov;148(11):5459-69

**Song W, Wilson CM, Allen S, Wang C, Li Y, Kaslow RA, Tang J.**

*Interleukin 18 and human immunodeficiency virus type I infection in adolescents and adults.*

Clin Exp Immunol. 2006 Apr;144(1):117-24.

**Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD**

*How cells respond to interferons.*

Annu Rev Biochem , 1998; 67: 227–264.

**Szostek S, Zawilinska B, Kopec J, Kosz-Vnenchak M.**

*Herpesviruses as possible cofactors in HPV-16-related oncogenesis.*

Acta Biochim Pol. 2009;56(2):337-42. Epub 2009 Jun 4.

**Sztajzel J, Mach F, Righetti A.**

*Role of the vascular endothelium in patients with angina pectoris or acute myocardial infarction with normal coronary arteries.*

Postgrad Med J. 2000 Jan;76(891):16-21.

**Tagawa A, Mezzacasa A, Hayer A, Longatti A, Pelkmans L, Helenius A.**

*Assembly and trafficking of caveolar domains in the cell: caveolae as stable, cargo-triggered, vesicular transporters.*

2005 Aug 29;170(5):769-79.

**Takano H, Nakagawa K, Ishio N, Daimon M, Daimon M, Kobayashi Y, Hiroshima K, Komuro I.**

*Active myocarditis in a patient with chronic active Epstein-Barr virus infection.*

Int J Cardiol. 2008 Oct 30;130(1):e11-3.

**Terletskaia-Ladwig E, Meier S, Hahn R, Leinmüller M, Schneider F, Enders M.**

*A convenient rapid culture assay for the detection of enteroviruses in clinical samples: comparison with conventional cell culture and RT-PCR.*

J Med Microbiol. 2008 Aug;57(Pt 8):1000-6.

**Thoelen I, Magnusson c, Tageruds S, Polacek C, Lindberg M, Van Ranst M.**

*Identification of Alternative Splice Products Encodes by the Human Cocksackie-AdenovirusReceptor Gene.*

Biochemical and Biophysical Research Communications 2001 Aug., 287, 216-222

**Thursz M, Yallop R, Goldin R, Trepo C, Thomas HC.**

*Influence of MHC class II genotype on outcome of infection with hepatitis C virus. The HENCORE group. Hepatitis C European Network for Cooperative Research.*  
Lancet. 1999 Dec 18-25;354(9196):2119-24.

**Tomko RP, Xu R, Philipson L.**

*HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses.*  
Proc Natl Acad Sci U S A 1997 May; 94 (7): 3352–6.

**Ranst M.**

*Identification of Alternative Splice Products Encoded by the Human Coxsackie-Adenovirus Receptor Gene.*

Biochemical and Biophysical Research Communications 2001 Aug; 287, 216–222.

**Uhrinova S, Lin F, Ball G, Bromek K, Uhrin D, Medof ME, Barlow PN.**

*Solution structure of a functionally active fragment of decay-accelerating factor.*  
Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Apr 15;100(8):4718-23.

**Van Linthout S, Savvatis K, Miteva K, Peng J, Ringe J, Warstat K, Schmidt-Lucke C, Sittinger M, Schultheiss HP, Tschöpe C.**

*Mesenchymal stem cells improve murine acute coxsackievirus B3-induced myocarditis.*  
Eur Heart J. 2010 Dec 22. [Epub ahead of print].

**Vasica G, Tennant CC.**

*Cocaine use and cardiovascular complications.*  
Med J Aust. 2002 Sep 2;177(5):260-2.

**Veliov VM**

*On the effect of population heterogeneity on dynamics of epidemic diseases.*  
J Math Biol. 2005 Aug;51(2):123-43.

**Verdino P, Witherden DA, Havran WL, Wilson IA.**

*The molecular interaction of CAR and JAML recruits the central cell signal transducer PI3K.*  
Science. 2010 Sep 3;329(5996):1210-4.



**Wagner KE, Hewlett JM, Bloom CD, Camerini D.** *Basic Virology*. Blackweel publishing, third edition, 2008.

**Wang Y, Singh A, Xu P, Pindrus MA, Blasioli DJ, Kaplan DL.**

*Expansion and osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on a vitamin C functionalized polymer.*  
Biomaterials. 2006 Jun;27(17):3265-73.

**Weeks DE, Lathrop GM.**

*Polygenic disease: methods for mapping complex disease traits.*  
Trends Genet. 1995 Dec;11(12):513-9.

**Williams P, Chaudhry Y, Goodfellow IG, Billington J, Powell R, Spiller OB, Evans DJ, Lea S.**

*Mapping CD55 function. The structure of two pathogen-binding domains at 1.7 Å.*  
J Biol Chem. 2003 Mar 21;278(12):10691-6.

**Wimmer E, Nomoto A.**

*Molecular biology and cell-free synthesis of poliovirus.*  
Biologicals. 1993 Dec;21(4):349-56.

**Wu JY, Liao C, Xu ZP, Chen JS, Gu SL.**

*A modified method to isolate and identify the adult mesenchymal stem cells from human bone marrow.*  
Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi. 2006 Jun;14(3):557-60.

**Yajima T, Knowlton KU.**

*Viral myocarditis: from the perspective of the virus.*  
Circulation. 2009 May 19;119(19):2615-24.

**Yang C, Li M, Limpakarnjanarat K, Young NL, Hodge T, Butera ST, McNicholl JM, Mastro TD, Lal RB.**

*Polymorphisms in the CCR5 coding and noncoding regions among HIV type 1-exposed, persistently seronegative female sex-workers from Thailand.*  
AIDS Res Hum Retroviruses. 2003 Aug;19(8):661-5.

**Yenigün A, Durupinar B.**

*Decreased frequency of the HLA-DRB1\*11 allele in patients with chronic hepatitis C virus infection.*

J Virol. 2002 Feb;76(4):1787-9.

**Yndestad A, Landrø L, Ueland T, Dahl CP, Flo TH, Vinge LE, Espevik T, Frøland SS, Husberg C, Christensen G, Dickstein K, Kjekshus J, Øie E, Gullestad L, Aukrust P.**

*Increased systemic and myocardial expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in clinical and experimental heart failure.*

Eur Heart J. 2009 May;30(10):1229-36.

**Xu S, De Becker A, Van Camp B, Vanderkerken K, Van Riet I.**

*An improved harvest and in vitro expansion protocol for murine bone marrow-derived mesenchymal stem cells.*

J Biomed Biotechnol. 2010;2010:105940.

**Zubiaurre L, Zapata E, Bujanda L, Castillo M, Oyarzabal I, Gutiérrez-Stampa MA, Cosme A.**

*Cytomegalovirus hepatitis and myopericarditis.*

World J Gastroenterol. 2007 Jan 28;13(4):647-8.

**Zipori D.**

*Mesenchymal stem cells: harnessing cell plasticity to tissue and organ repair.*

Blood Cells Mol.Dis. 33.3 (2004): 211-15.

**Zuckerman AJ, Banatvala JE, Griffiths P.**

*Principles and practice of clinical virology.* Wiley blackwell, 2009.